Bestimmung einiger Enzymaktivitäten und Zwischenstoffkonzentrationen des Citratzyklus in der Mamma des Rindes unter verschiedenen physiologischen Bedingungen

Stefan Rilling

1972

Aus dem Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan der Technischen Universität München

Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

BESTIMMUNG EINIGER ENZYMAKTIVITÄTEN UND ZWISCHENSTOFFKONZENTRATIONEN DES CITRATZYKLUS IN DER MAMMA DES RINDES UNTER VERSCHIEDENEN PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Stefan Rilling
aus
Oberkirchberg

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München

Referent: Prof. Dr. H. Karg
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Baier
Tag der Promotion: 14. Juli 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einführung und Literatur	1
1.1. Morphologische und funktionelle Entwicklung der Mamma	1
1.2. Mammogener Hormonkomplex	2
1.3. Biochemische Veränderungen in der Mamma	4
1.3.1. Allgemeines über Bedeutung und Messung biochemischer Veränderungen	4
1.3.2. Veränderungen im Laufe der Entwicklung	6
1.3.2.1. Befunde an Labortieren	6
1.3.2.2. Befunde an der Kuh	9
1.3.3. Citronensäurezyklus	10
1.3.3.1. Bedeutung des Citronensäurezyklus im intermediären Stoffwechsel	11
1.3.3.2. Bisherige Befunde über Veränderungen im Citronensäurezyklus während der Entwicklung der Mamma	11
1.3.4. Allgemeine Betrachtungen und Zielsetzung dieser Arbeit	13
2. Arbeitsmethoden	16
2.1. Untersuchungsmaterial	16
2.2. Bestimmung von Enzymaktivitäten	17
2.2.1. Aufarbeitung des Gewebes	17
2.2.2. Allgemeines zur Aktivitätsbestimmung	18
2.2.3. Bestimmung der Citrat-Synthase	19
2.2.4. Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase (NADP-spezifisch)	20
2.2.5. Bestimmung der ATP-Citrat-Lyase (Citrate-Cleavage-Enzyme)	21
2.3. Bestimmung von Zwischenstoffkonzentrationen	25
2.3.1. Gewinnung des Extraktes	25
2.3.2. Bestimmung von Citrat	26
2.3.3. Bestimmung von Isocitrat	28
2.3.4. Bestimmung von Acetyl-Coenzym A	30

Seite

2.4. Untersuchungen zur Kontrolle der Euterproben 32
2.4.1. Laktosebestimmung 33
2.4.2. Bestimmung von DNS, RNS und Fett 33
2.4.2.1. Extraktion des Fettes 34
2.4.2.2. Extraktion von DNS und RNS 34
2.4.2.3. Bestimmung von DNS nach BURTON 34
2.4.2.4. Bestimmung von RNS mit Orcin 35
2.4.3. Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode 35
2.5. Berechnung der Meßergebnisse 36
2.6. Auswertung der Meßergebnisse 37

3. Ergebnisse 38
3.1. Kontrolluntersuchungen 38
3.2. Enzymaktivitäten 40
3.2.1. Citrat-Synthase 40
3.2.2. Isocitratdehydrogenase 48
3.2.3. ATP-Citrat-Lyase 54
3.3. Zwischenstoffkonzentrationen 54
3.3.1. Citrat 54
3.3.2. Isocitrat 57
3.3.3. Acetyl-Coenzym A 60
3.4. Prolaktin-Antiprolaktin-Tastversuche 62

4. Diskussion 64
4.1. Besprechung der eigenen Ergebnisse 64
4.1.1. Bezugsgrößen und Einteilung des Untersuchungsmaterials 64
4.1.2. Citrat-Synthase 66
4.1.3. Isocitratdehydrogenase 66
4.1.4. Citrat-Lyase 68
4.1.5. Citrat 68
4.1.6. Isocitrat 69
4.1.7. Acetyl-Coenzym A 69
4.2. Vergleich unserer Ergebnisse mit bereits aus der Literatur bekannten Werten 70
4.2.1. RNS-Gehalt und RNS/DNS-Quotient 70

Seite

4.2.2. Citrat-Synthase 71
4.2.3. Isocitratdehydrogenase 71
4.2.4. ATP-Citrat-Lyase 72
4.2.5. Citrat 73
4.2.6. Isocitrat 74
4.2.7. Acetyl-Coenzym A 74
4.3. Allgemeine Diskussion der biochemischen und physiologischen Zusammenhänge 75

5. Zusammenfassung 79

6. Literaturverzeichnis 82

Lebenslauf

1. Einführung und Literatur

1.1. Morphologische und funktionelle Entwicklung der Mamma

Die Mamma erfährt im Laufe von Entwicklung, Gravidität, Gebären und Laktation starke morphologische Veränderungen.

Die Milchdrüse ist im frühembryonalen Zustand als Milchleiste angelegt. Nach NEUMANN (1970) hängt die Differenzierung der Milchdrüse in weibliche oder männliche Richtung nur davon ab, ob in einer bestimmten Phase der Foetalentwicklung Androgene wirksam werden oder nicht.

Von der Geburt bis zum Einsetzen der Pubertät ist das Wachstum der Milchdrüse sehr gering. Diese Zeitspanne wird auch als die ruhende Phase der Drüsenentwicklung bezeichnet. In dieser Zeit ist das Wachstum der Ausführungsgänge bei den einzelnen Tierarten verschieden. Bei Kaninchen und Katze bleiben die Milchgänge sehr klein und unterentwickelt, während sie bei der Maus, der Ratte und beim Wiederkäuer eine, wenn auch geringe, Differenzierung erreichen (COWIE 1971).

Das nächste Wachstum der Mamma erfolgt während der Pubertät und ist eng mit dem Sexualzyklus verbunden. In dieser Zeit wurde die Größenzunahme der Milchdrüse im Vergleich zur Zunahme der Körperoberfläche (COWIE 1971) und die Gewichtszunahme der Drüse (siehe MUNFORD 1964) bei zahlreichen Tierarten untersucht.

Es wurde festgestellt, daß das Wachstum der Mamma schon einige Tage vor dem Beginn des ersten Oestrus einsetzt. In dieser Zeit nimmt die Oberfläche der Mamma um das drei- bis vierfache (bei der Ratte) bzw. fünf- bis achtfache (bei der Maus) schneller zu als die Oberfläche des Körpers (siehe COWIE 1971).

Der Gehalt an Desoxyribonucleinsäure (DNS) ist unter gewissen Voraussetzungen ein Maß für die Zellzahl. Nach SINHA und TUCKER (1969) nahm beim Kalb bereits von der Geburt bis zum 12. Lebensmonat der DNS-Gehalt in der Mamma schneller zu als das Körpergewicht. Beim Einsetzen des Sexualzyklus im Alter von 6 bis 7 Monaten ist das Drüsenwachstum noch stärker beschleunigt, ähnlich wie bei der Ratte und Maus.

Während der ersten Trächtigkeit wird das Wachstum noch weiter beschleunigt. Das spezielle Drüsengewebe füllt allmählich den Raum des ursprünglichen Stromas aus, bis schließlich in der reifen Milchdrüse die einzelnen Drüsenlappen und -läppchen nur noch durch Septen getrennt werden. Das Wachstum des Drüsengewebes durch Zellteilung ist dabei nach den ersten 6 Monaten der Trächtigkeit beendet und die Größenzunahme der Mamma geschieht in den letzten drei Monaten hauptsächlich durch Vergrößerung der Alveolen.

Um festzustellen, wann und wie lange Zellteilungen in der Mamma stattfinden, wurde der Ribonucleinsäure(RNS)- und DNS-Gehalt der Mamma bei vielen verschiedenen Tierarten im Laufe der Mammaentwicklung untersucht (siehe MUNFORD 1964). So treten während der Entwicklung charakteristische Veränderungen im DNS- und RNS-Gehalt auf. Der Gehalt an RNS nimmt von der frühen Trächtigkeit bis zur späten Laktation laufend zu und während der Involution wieder ab. Der Gehalt an DNS nimmt während der Trächtigkeit zu, bleibt dagegen im Laufe der Laktation annähernd konstant. Diese Veränderungen des DNS-Gehaltes stehen wahrscheinlich direkt mit der Zunahme der Zellzahl in Verbindung (GREENBAUM und SLATER 1957).

1.2. Mammogener Hormonkomplex

Die Veränderungen am Euter werden im Laufe der Milchdrüsenentwicklung und -funktion in vivo unter physiologischen Bedingungen durch Hormone induziert und reguliert.

Die hormonelle Kontrolle der Mammaentwicklung ist schon seit längerer Zeit Gegenstand ausgedehnter Studien. Eine Übersicht über den Stand der hormonellen Beeinflussung geben u. a. KON und COWIE (1961), FOLLEY (1961), KUHN (1971), COWIE (1971) und KARG (1972).

Man muß die Milchdrüse sowohl als sekundäres Geschlechtsorgan als auch als Stoffwechselorgan betrachten. Sie wird daher sowohl durch Hormone des allgemeinen Stoffwechsels als auch durch spezifische Geschlechtshormone gesteuert. Übergeordnet ist das Hypothalamus-Hypophysen-System.

Als Wirkungsweise der Östrogene wird einerseits für das Wachstum des Gangsystems ein direkter Effekt angenommen, andererseits wird aber auch die Sekretion der das Wachstum des Milchdrüsengewebes steuernden Hormone, wie Prolaktin, Wachstumshormon und ACTH, aktiviert. Prolaktin, Wachstumshormon, die Corticosteroide und Östrogene wirken direkt auf das Milchdrüsengewebe. Synergistische Bedeutung haben noch die Stoffwechselhormone Insulin und Thyroxin.

Durch den Melkreiz wird die Entwicklung der Milchdrüse ebenfalls gefördert; dies hängt möglicherweise mit der Freisetzung von Prolaktin nach dem Melkreiz zusammen (SCHAMS 1970).

Die exakten Angriffspunkte bei den hormonellen Regulationsvorgängen sind noch nicht genau bekannt. Dazu ist das Studium der biochemischen Veränderungen am Erfolgsorgan, der Mamma, notwendig.

Ein Befund bei Labortieren ist in diesem Zusammenhang der rasche Wechsel der Enzymaktivität in der Mamma zu Laktationsbeginn. BALDWIN und MILLIGAN (1966) behaupten, daß bei Ratten der Grund hierfür der Ersatz nichtsekretorischer Zellen durch epitheliale sekretorische Zellen sei, und daß für die Annahme

einer hormonellen Beeinflussung von spezifischen Enzymen keine Notwendigkeit bestünde.

Daß sich die biochemischen Eigenschaften der Mammazellen ändern können, wurde an Zellkulturen demonstriert. Bovine Mammazellen verlieren nach zwei Tagen in der Kultur ihre Fähigkeit, Laktose zu synthetisieren, während sie ß-Lactoglobulin noch mehrere Wochen lang synthetisieren können (TWAROG und LARSON 1964).

Bei Explantaten der Mäusemamma konnte durch Prolaktin in Abwesenheit von Mitosen Laktogenese hervorgerufen werden: deshalb muß das Hormon die biochemischen Eigenschaften der einzelnen Zellen verändern.

1.3. Biochemische Veränderungen in der Mamma

1.3.1. Allgemeines über Bedeutung und Messung biochemischer Veränderungen

Um einen näheren Einblick in die biochemischen Veränderungen der Milchdrüse zu gewinnen, ist es vor allem interessant, die Lage der Fließgleichgewichte des intermediären Stoffwechsels festzustellen.

Das beste Maß für die Lage der Fließgleichgewichte und damit auch für Veränderungen des intermediären Stoffwechsels in vivo sind die stationären Zwischenstoffkonzentrationen der am intermediären Stoffwechsel beteiligten Coenzyme und Substrate.

Außerdem wird eine Reaktionsfolge von den beteiligten Enzymen kontrolliert. Dabei gibt es für die einzelnen Stoffwechselzyklen ganz bestimmte Schrittmacherreaktionen, die praktisch irreversibel sind. Bei einer Hemmung einer dieser Re-

aktionen - z.B. durch Hemmung des dazugehörigen Schrittmacherenzyms - bildet sich ein Stau in der Reaktionsfolge aus. Die Bestimmung und Messung der Aktivität solcher Enzyme gibt deshalb besonderen Aufschluß über den Durchfluß durch einen Stoffwechselzyklus.

Allerdings muß betont werden, daß die kinetische Energie eines Enzyms, das einzeln betrachtet wird, sehr hoch sein und dabei im Verband einer Stoffwechselkette nur eine untergeordnete Rolle spielen kann. Es ist deshalb notwendig, daß man die kinetische Energie eines Enzyms zusammen mit der Konzentration seiner Substrate, Aktivatoren und Inhibitoren und seiner Stellung im Stoffwechselzyklus analysiert (LOWRY und PASSONEAU 1964; HESS und BRAND 1965).

Die Enzymaktivitäten und Zwischenstoffkonzentrationen im Euter werden (nach Abzug des Milchgehaltes im Euter) auf das Frischgewicht bezogen (GREENBAUM und SLATER 1957; Mc LEAN 1958; BALDWIN und MILLIGAN 1966). Die Milchmenge wird auf Grund des Laktosegehaltes im Euter geschätzt. Die Bestimmung der Laktose ist zwar nicht ganz spezifisch (GUL und DILS 1969), doch ist die Konzentration anderer Zucker im Drüsengewebe verhältnismäßig gering und kann daher vernachlässigt werden.

Die gegenwärtigen Techniken der Homogenisierung von Frischgewebe zur Messung von Enzymaktivitäten führen oft zu einem unvollkommenen Aufschluß des Gewebes. Deshalb ist es sicherer, die Aktivität statt auf g Gewebe auf mg Protein im Homogenat zu beziehen. GUL und DILS (1969) konnten bei verschiedenen Enzymen der Ratten- und Kaninchenmamma nachweisen, daß deren Aktivität pro mg Protein sich mit der Menge der zurückgehaltenen Milch nicht ändert; so erscheint die Proteinmenge als eine gute Bezugsgröße.

Allgemein kann eine Steigerung von Enzymaktivitäten oder Zwischenstoffkonzentrationen von einer Zunahme der Aktivität (Zwischenstoffkonzentration) in der Einzelzelle stammen (MAYER und KLEIN 1961) oder von einer Zunahme der Zahl der Drüsenzellen (MUNFORD 1963). Der DNS-Gehalt ist ein Maß für die Anzahl der Zellen (MUNFORD 1964; DENAMUR 1964). Deshalb ist es aufschlußreich, sowohl die Enzymaktivitäten als auch die Zwischenstoffkonzentrationen auf mg DNS zu beziehen.

1.3.2. Veränderungen im Laufe der Entwicklung

Über die Biochemie der Mamma existiert eine umfangreiche Literatur. Die Untersuchungen wurden zum größten Teil an der Mamma von Labortieren durchgeführt; Befunde über die Milchdrüse beim Rind liegen nur sehr wenige vor.

Die wichtigsten Untersuchungen und Ergebnisse sind bei FOLLEY (1961), KON und COWIE (1961), MUNFORD (1964) JONES (1969), BALDWIN (1966, 1969), COWIE (1971), KUHN (1971) und GREENBAUM, Mc LEAN und GUMAA (1971) zu finden.

Dabei wurden vor allem drei Untersuchungswege gewählt: Erstens wurden die biochemischen Veränderungen bei normalen Tieren in verschiedenen Laktationsstadien untersucht. Zweitens wurden an normalen oder operierten Tieren, in welchen die Laktation durch Hormone hervorgerufen oder aufrechterhalten wurde, die Veränderungen der Milchdrüse studiert, und drittens wurde Milchdrüsengewebe in vitro gezüchtet und versucht, die Laktation durch entsprechende Hormone zu induzieren.

1.3.2.1. Befunde an Labortieren

Über einen raschen Anstieg des RNS/DNS-Quotienten post partum in der Rattenmamma berichten BALDWIN und MILLIGAN (1966) und bei der Mamma der Maus MUNFORD (1964) und KUHN und LOWENSTEIN (1967).

BALDWIN und MILLIGAN (1966) untersuchten einige Enzymaktivitäten in der Mamma der Ratte. Bei 18 von 20 untersuchten Enzymen, deren Aktivität sowohl pro g Gewebe als auch pro mg DNS angegeben wurde, zeigte sich post partum eine beträchtliche Zunahme der Aktivität, die in den meisten Fällen um den 20. Tag der Laktation persistierte. Die Veränderungen waren besonders deutlich bei Enzymen, die für die Synthese von Milchbestandteilen wichtig sind, aber auch bei anderen wie Malatdehydrogenase und Isocitratdehydrogenase. Andere Enzyme nahmen bei der Ratte post partum ebenfalls zu, so z.B. Acetyl-CoA-Carboxylase (HOWANITZ und LEVY 1965), Laktose-Synthetase (KUHN 1968), Fettsäure-Synthase und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (GREENBAUM, Mc LEAN und GUMAA 1971).

Zu Beginn der Laktation nimmt - wohl vor allem wegen der verstärkten Fettbildung - die Aktivität des Hexose-Monophosphat-Zyklus zu. Die Aktivität der oxydativen Enzyme dieses Zyklus war beim Einsetzen der Laktation in der Rattenmamma noch stärker angestiegen als die der nichtoxydativen Enzyme dieses Zyklus und der anderen NADPH erzeugenden Enzyme (KATZ und ROGNSTAD 1966).

Die Aktivität der NADP-Malat-Dehydrogenase war in allen Laktationsstadien bei Ratten sehr hoch (GUL und DILS 1969) und fehlte in der Mamma des Schweines (BAUMAN, BROWN und DAVIS 1970) und des Kaninchens (GUL und DILS 1969).

In der Mamma der Maus stiegen die Aktivitäten einiger Enzyme zu Beginn der Laktation an und fielen beim Absetzen der Jungen wieder ab (MUNFORD 1964).

JONES (1969) beschreibt bei der Ratte ca. 24 Std. nach Absetzen der Jungen und ebenso 24 Std. nach Hypophysektomie der laktierenden Ratten eine ähnliche Veränderung der Enzymaktivitäten pro mg Protein. Die sieben untersuchten Enzyme fielen während der ersten 12 Std. rasch ab und blieben dann verhältnismäßig

stabil auf einem niedrigen Niveau.

GREENBAUM, Mc LEAN und GUMAA (1971) berechneten die in vivo Aktivitäten einiger Enzyme in der Rattenmamma an Hand der an der Reaktion beteiligten Metabolite. Sie konnten nach dem Absetzen der Jungen am 14. Lebenstag eine verminderte Aktivität der für die Glykolyse geschwindigkeitsbestimmenden Phosphofruktokinase, des Verhältnisses Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase/3-Phosphoglycerat-Kinase, der Pyruvat-Kinase und des Verhältnisses α-Ketoglutarat-Oxidase/Succinat-Dehydrogenase und einen Anstieg der Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase feststellen. Beim Wiedereinsetzen der Laktation ergab sich genau der umgekehrte Vorgang. Diese Befunde stimmen mit denen von BALDWIN und CHENG (1969), die die Enzyme direkt bestimmten, überein.

In ihrer sehr breit angelegten Arbeit, in der sie alle für den Kohlenhydrat-Stoffwechsel wichtigen Zwischenstoffkonzentrationen bestimmten, fanden GREENBAUM, Mc LEAN und GUMAA (1971) außerdem in der Rattenmamma einen Anstieg von ATP und ADP und einen Abfall von AMP während der Laktation im Vergleich zur Trächtigkeit. Malat war während der Laktation höher, Pyruvat und Laktat blieben unverändert. Beim Absetzen der Jungen verringerten sich die Konzentrationen von ATP, ADP, AMP und von Malat. Pyruvat und Laktat blieben auf dem gleichen Niveau.

Die Untersuchungen von GREENBAUM et al. ergaben außerdem noch folgendes: Die Zwischenstoffkonzentrationen des Hexose-Monophosphat-Zyklus lagen beim Absetzen der Jungen unter den Werten der laktierenden Mamma und stiegen beim Wiedereinsetzen der Laktation auf die ursprünglichen Werte an.

Die Konzentration der CoA-Verbindungen der langkettigen Fettsäuren nahm beim Wiedereinsetzen der Laktation sehr rapide ab und beim Absetzen beträchtlich zu.

Um den die Laktation regulierenden Mechanismus der Mamma zu klären, wurden außerdem die feed-back Hemmung durch biosynthetische Enzyme (LEVY 1964), die Enzymaktivität bei verschiedenen Tieren (BREW, VANAMAN und HILL 1968; KUHN 1968; LACHANCE, MORAIS 1965), die Regulation der Proteinsynthese (BREW und CAMPBELL 1967) und der Transport von Zwischenstoffen in der Mamma (SPENCER und LOWENSTEIN 1966) untersucht. Aber alle bisherigen Daten haben den Mechanismus der Regulation der Laktation nicht klären können.

1.3.2.2. Befunde an der Kuh

BALDWIN (1966) untersuchte 20 Enzyme an Hand von Biopsieproben 14 Tage vor und nach Einsetzen der Laktation. Er konnte keine signifikanten Veränderungen der Aktivität pro g Eutergewebe und pro mg DNS feststellen. Allerdings waren prae partum schon relativ hohe Aktivitäten vorhanden, was die Frage aufwirft, ob bei der Kuh biochemische Veränderungen nicht schon früher eintreten und nicht erst mit Beginn der Laktation. Die Vermutung liegt nahe, daß bei der Kuh beim Einsetzen der Laktation keine so raschen zellulären und enzymatischen Veränderungen auftreten wie bei den anderen untersuchten Spezies (BALDWIN 1966). Eine Möglichkeit bestünde darin, daß das Einsetzen der Laktation hier von einer Änderung im Blutdurchfluß durch die Milchdrüse oder von Änderungen der Konzentration der Milchvorläufer herrührt (BALDWIN und CHENG 1969). Die Autoren diskutieren, daß an der Regulation der Laktogenese u.a. ein oder mehrere intramammäre Systeme beteiligt sind.

BALDWIN et al. (1969) bestimmten einige Enzymaktivitäten und Zwischenstoffkonzentrationen des Kuheuters in Abhängigkeit von der Fütterung mit Heu oder Kraftfutter. Hierbei konnten sie keine signifikanten Veränderungen der Enzymaktivitäten nachweisen. Hingegen war die intermediäre Konzentration von Phosphoenol-Pyruvat bis zu 10mal höher bei Kühen, die mit Kraft-

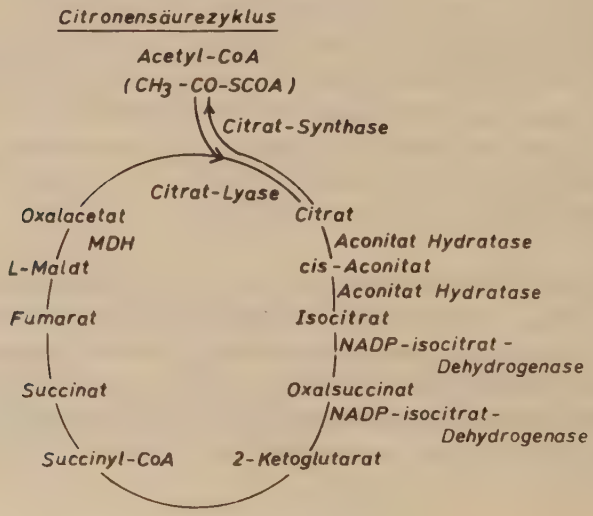
futter gefüttert wurden. Dies mag von einer Hemmung der Pyruvat-Kinase-Aktivität herrühren. Außerdem war bei der Fütterung mit Kraftfutter die Malat-Konzentration geringer, während die Konzentration von α -Glycerophosphat und ATP zunahmen.

Bei Untersuchungen am hiesigen Institut (WALDSCHMIDT), die an verschiedenen Euterproben von Schlachttieren durchgeführt wurden, fand sich bei laktierenden Kühen pro g Euter deutlich mehr ATP und anorganisches Phosphat und weniger AMP als bei trockenstehenden Kühen oder Kalbinnen.

BALDWIN und CHENG (1969) konnten an einigen Biopsieproben, die Kühen 14 Tage vor und 14 Tage nach der Geburt entnommen wurden, keine signifikant verschiedenen Konzentrationen von ATP, ADP und AMP pro g Euter feststellen.

Das Verhältnis NADP/NADPH im Cytoplasma war bei laktierenden Kühen viel niedriger als bei trockenstehenden Kühen oder Kalbinnen (WALDSCHMIDT).

1.3.3. Citronensäurezyklus



1.3.3.1. Bedeutung des Citronensäurezyklus im intermediären Stoffwechsel

Die Aufgabe des Citronensäurezyklus für den Energiestoffwechsel besteht hauptsächlich in der Lieferung des Wasserstoffs für die Atmungskette. Hier werden chemische Energien freigesetzt, die bei dem großen Energieverbrauch für die Milchbildung sehr wesentlich sein dürften.

Daneben stellt der Citronensäurezyklus eine Verbindung zwischen verschiedenen Abbau- und Aufbauwegen her. Er dient als Sammelbecken für den Fett-, Protein- und Kohlenhydratstoffwechsel. In ihm werden die Stoffe in eine Form gebracht, die allgemeine Reaktionen ermöglicht.

1.3.3.2. Bisherige Befunde über Veränderungen im Citronensäurezyklus während der Entwicklung der Mamma

In der Rattenmamma war die Aktivität der Citrat-Synthase in allen Laktationsstadien sehr viel höher als die der Phosphofruktokinase (GREENBAUM, Mc LEAN und GUMAA 1971); sie nahm in der Laktation gegenüber der Trächtigkeit um den Faktor 2,5 zu (BALDWIN und MILLIGAN 1966; HOWANITZ und LEVY 1965).

Außerdem fanden GREENBAUM et al. (1971) bei der Ratte eine sehr niedrige Aktivität der Bernsteinsäure-Dehydrogenase und der Isocitrat-Dehydrogenase in den Mitochondrien, verglichen mit dem cytoplasmatischen Enzym. Die geringere Oxydationsrate von Acetyl-CoA in einem Fett synthetisierenden Gewebe, wie es die Milchdrüse darstellt, könnte damit zusammenhängen. Die besonderen Bedürfnisse der Mamma sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, daß zu Anfang und Ende des Citratzyklus sehr hohe und dazwischen relativ niedrige enzymatische Aktivitäten zu finden sind. Nach anderen Autoren fällt außerdem die hohe Aktivität der Glutamat-Asparat-Transaminase, die die Transport-

form von Oxalacetat, das Aspartat, herstellt, auf (WILLIAMSON, SCHOLTZ und BROWNING 1969; ROGNSTADT und KATZ 1970).

Die Aktivität der ATP-Citrat-Lyase war in allen Laktationsstadien geringer in der Mamma des Kaninchens (GUL und DILS 1969), des Meerschweinchens (BALDWIN 1966) und des Schweines (BAUMAN, BROWN und DAVIS 1970) als in der Mamma der Ratte, in der sie sehr hoch war (GREENBAUM, Mc LEAN und GUMAA 1971; BAUMAN, BROWN und DAVIS 1970). Im Unterschied dazu war die Aktivität der NADP-Isocitrat-Dehydrogenase in der Mamma des Kaninchens, des Meerschweinchens und des Schweines zwei- bis dreimal höher als in der Rattenmamma.

Außerdem fanden BAUMAN et al. eine sehr hohe Aktivität der NADP-Isocitrat-Dehydrogenase in der Mamma der Kuh gegenüber der Rattenmamma. Sie vermuteten deshalb, daß die NADP-Isocitrat-Dehydrogenase hier die Hauptquelle für die Erzeugung von NADPH ist.

Die Beziehung der NADP-Isocitrat-Dehydrogenase zum Einsetzen der Laktation wurde bei der Ratte, dem Meerschweinchen und dem Kaninchen untersucht. Bei den letzten beiden Arten nahm die Aktivität von der späten Trächtigkeit bis zur Mitte der Laktation um das drei- bis achtfache zu (GUL und DILS 1969; BALDWIN und MILLIGAN 1966). Parallel zu der Aktivität der Isocitratdehydrogenase steigt auch die Verfügbarkeit von Acetat für die Fettsäuresynthese bei dem einzelnen Tier, was auf eine unterschiedliche mikrobiologische Fermentation im Verdauungstrakt zurückzuführen ist.

BAUMAN, BROWN und DAVIS (1970) untersuchten die Wege der Fettsäuresynthese in der Mamma der Kuh. Sie stellten fest, daß in der Milchdrüse des Rindes Glukose nicht als Vorläufer für die Fettsäure dient. Dies hängt wahrscheinlich mit der weitgehenden Ausschaltung des Citrat-Abbaus zusammen, d.h. mit der sehr

niedrigen Aktivität von ATP-Citrat-Lyase und NADP-Malat-Dehydrogenase. HARDWICK (1966), der die Mamma der Ziege untersuchte, erhielt ähnliche Resultate. Die mangelnde Aktivität der ATP-Citrat-Lyase beim Wiederkäuer führt zu einem hohen intramitochondrialen Acetyl-CoA-pool, der für das Cytoplasma nicht zur Verfügung steht, da Acetyl-CoA nicht in das Cytoplasma diffundieren kann (LOWENSTEIN 1968).

Werte für die Zwischenstoffkonzentrationen des Citratzyklus liegen hauptsächlich von der Arbeitsgruppe GREENBAUM und Mc LEAN vor (1971). Sie fanden in der Rattenmamma in der Laktation gegenüber der Schwangerschaft eine Zunahme von Acetyl-CoA und Isocitrat sowie eine Abnahme von CoA und Citrat. Das Citrat nahm dabei im Cytoplasma zu und in den Mitochondrien ab. Gegenläufig zur Abnahme von Citrat wurde in den Mitochondrien eine Zunahme von Acetyl-CoA, Citrat und Isocitrat gefunden, während die Konzentration von freiem CoA gleich hoch blieb.

Außerdem wurde in den Versuchen von WALDSCHMIDT gefunden, daß die intermediäre Konzentration von α-Ketoglutarat bei laktierenden Kühen sehr stark erhöht ist gegenüber Kalbinnen und trockenstehenden Kühen. Die Konzentration von L-Malat verhält sich ähnlich, weist aber nicht so starke Unterschiede zwischen den Laktationsstadien auf.

1.3.4. Allgemeine Betrachtungen und Zielsetzung dieser Arbeit

Der rasche Anstieg der Enzymaktivitäten in der Mamma der Labortiere (Ratte, Maus) zur Zeit der Geburt läßt vermuten, daß eine niedrige Aktivität der Enzyme die Laktogenese während der Schwangerschaft unterdrückt.

Das Fehlen entsprechender Veränderungen bei der Kuh wirft einige Probleme auf. Es ist allerdings möglich, daß die Synthese von Milchbestandteilen durch feed-back-Mechanismen (die Anhäufung von hemmenden Metaboliten), die beim Saugakt aufgehoben

werden, begrenzt wird; aber der Gehalt einiger der in Frage kommenden Metabolite (z.B. der Laktose) in der Mamma ist bereits bei der Geburt sehr hoch (KUHN und LOWENSTEIN 1967).

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß eine Blutschranke für die Metabolite besteht, die bei der Geburt niedergerissen wird. Kenntnisse über den tatsächlichen Gehalt der Metabolite in der Mamma vor und nach der Geburt wären dafür notwendig.

Wie in den vorangehenden Kapiteln gezeigt wurde, sind für Enzymaktivitäten und Zwischenstoffkonzentrationen in den verschiedenen Laktationsstadien bedeutende Speciesunterschiede zu erwarten. Wegen der Selektion des Rindes auf Milchleistung lassen sich die Ergebnisse von Labortieren nicht unbedingt auf das Rind übertragen.

Um die Kenntnisse über die biochemischen Eigenschaften der Mamma des Rindes etwas zu erweitern und zu vertiefen, haben wir uns daher zunächst mit der Bestimmung von Enzymaktivitäten und Zwischenstoffkonzentrationen des Citronensäurezyklus beschäftigt.

Im einzelnen wurden von mir folgende Bestimmungen durchgeführt: 1. Isocitratdehydrogenase, 2. Citrat-Synthase, 3. ATP-Citrat-Lyase, 4. Citrat, 5. Isocitrat, 6. Acetyl-CoA.

Vor allem die Isocitratdehydrogenase scheint in der Mamma des Rindes besonders aktiv zu sein (BAUMAN et al. 1970). Die Citrat-Synthase scheint zumindest bei den Labortieren beim Einsetzen der Laktation sehr stark anzusteigen (BALDWIN und MILLIGAN 1966; HOWANITZ und LEVY 1965; GREENBAUM et al. 1971), während der Umsatz der ATP-Citrat-Lyase beim Rind anscheinend sehr gering ist (BAUMAN et al.).

Die Zwischenstoffkonzentrationen von Citrat, Isocitrat und

Acetyl-CoA sind von großer Bedeutung für die in vivo-Aktivität der erwähnten Enzyme. Auch bei ihnen wurden entscheidende Veränderungen an Labortieren beobachtet (GREENBAUM et al. 1971). Bei Metaboliten, die weiter hinten im Citronensäurezyklus stehen (α -Ketoglutarat, Malat) wurden beim Rind erhöhte Konzentrationen während der Laktation beobachtet (WALDSCHMIDT). Deshalb erschien uns die Bestimmung der Metabolite, die am Anfang des Citronensäurezyklus stehen, beim Rind in verschiedenen Laktationsstadien besonders interessant; sie zeigt nämlich, ob auch in diesem Teil des Zyklus während der Laktation ein Stau der Stoffwechselprodukte stattfindet und läßt damit gewisse Rückschlüsse auf die mögliche Ursache dieses Staus zu.

2. Arbeitsmethoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Als Tiermaterial standen uns Höhenfleckviehrinder vom Schlachthof Freising zur Verfügung, die rein äußerlich gesund waren. Das Alter der Tiere wurde an Hand der Hornringe und des Zahnalters bestimmt. Eine Untersuchung auf Gravidität erfolgte nach der Schlachtung. Fütterung und sonstige Umwelteinflüsse waren bei diesem Tiermaterial unterschiedlich.

Für die enzymatisch-optischen Tests verwendeten wir folgende Enzyme der Firma Boehringer, Mannheim:

Malat-Dehydrogenase aus Schweineherz (MDH)

Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz (LDH)

Citrat-Lyase aus Aerobacter aerogenes

Citrat-Synthase aus Schweineherz

Isocitrat-Dehydrogenase aus Schweineherz

Ebenfalls von der Firma Boehringer erhielten wir: Coenzym A (CoA), Oxalacetat, oxydiertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid als freie Säure (NAD) und reduziert als di-Natriumsalz (NADH), oxydiertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat als freie Säure (NADP) und reduziert als tetra-Natriumsalz (NADPH), Adenosin-5'-triphosphat (ATP).

Von der Firma Fluka A.G., Buchs, Schweiz: 5,5-Dithio-bis-(2-Nitro-Benzoesäure)(DTNB), DL-Isocitronensäurelacton, Desoxyribonucleinsäure (DNS) und Ribonucleinsäure (RNS).

Von der Firma Schuchardt, München: Dithiothreit.

Alle übrigen Chemikalien waren Präparate der Firma Merck von höchstem Reinheitsgrad. Es wurde bidestilliertes Wasser aus

einer Quarzapparatur verwendet.

Durch Zusatzversuche wurde geprüft, ob Zuführung von Prolaktin oder Antiprolaktinserum einen Einfluß auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzymaktivitäten und Zwischenstoffkonzentrationen ausübt. Zu diesem Zweck wurde einer 6 Jahre alten laktierenden Kuh eine Stunde vor der Schlachtung 15 mg Rinder-Prolaktin NIH-P-B 2 mit einer biologischen Aktivität von 19,9 Units/mg intravenös injiziert. Außerdem wurde einer 7 Jahre alten laktierenden Kuh 20 ccm Antiprolaktinserum vom Kaninchen (siehe SCHAMS 1970) 22 Stunden vor der Schlachtung intravenös injiziert.

2.2. Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.2.1. Aufarbeitung des Gewebes

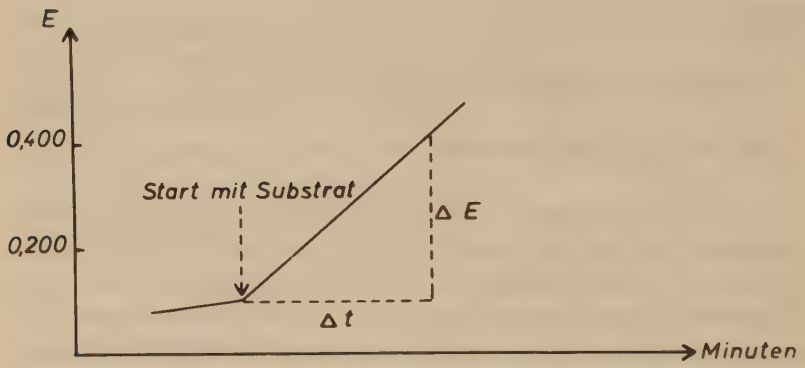
Sofort nach der Betäubung der Kuh wurden einige Gramm Eutergewebe entnommen und in Eis gekühlt. Anschließend wurde das Gewebe im Kühlraum mit einer Schere zerkleinert und mit der 5-fachen Menge isotonischer Rohrzuckerlösung 0,04 M an Trispuffer pH 7,8 unter Eiskühlung im Glashomogenisator nach POTTER-ELVEHJEM homogenisiert. Das Homogenat wurde dann 20 Min. lang bei 38 000 g in der Kälte zentrifugiert. Dabei setzten sich Zelltrümmer, Zellkerne und Mitochondrien ab, während das Cytoplasma und die Mikrosomen im Überstand blieben. Für die Aktivitätsbestimmung der Enzyme benützten wir das Cytoplasma.

Anfangs wurde die enzymatische Aktivität aber auch in den Mitochondrien bestimmt. Diese wurden folgendermaßen gewonnen: Zuerst werden aus dem Homogenat Zellkerne und Zelltrümmer (5 Min., 1000 g) in der Kälte abzentrifugiert. Aus dem Überstand werden die Mitochondrien zentrifugiert (20 Min., 38 000 g); diese werden dann zweimal mit je 10 ml Rohrzuckerlösung suspendiert und jedesmal zentrifugiert (15 Min., 38 000 g). Der Rückstand wird in 2 bis 5 ml Rohrzuckerlösung suspendiert und für die Bestim-

mung verwendet.

2.2.2. Allgemeines zur Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität eines Enzyms wird durch die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion definiert. Eine Einheit E (International Unit = U) ist die Enzymmenge, die 1 µ Mol Substrat in der Minute umsetzt. Ein Maß für die Geschwindigkeit dc/dt ist beim enzymatisch-optischen Test die Veränderung der Extinktion in der Zeiteinheit Δ E/ Δt.



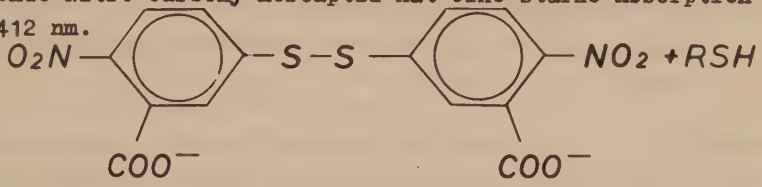
Dabei ist besonders zu beachten, daß durch die Enzyme katalysierte Reaktionen sehr empfindlich gegen Temperaturänderungen sind. Der Temperaturkoeffizient beträgt 10 % pro Grad und mehr. Wir arbeiteten bei einer Temperaturkonstanz von 25° C ∓ 0,1° C. Außerdem hat jedes Enzym einen optimalen pH-Bereich seiner Wirksamkeit. Um vergleichbare Werte zu erhalten, muß das Enzym mit Substrat gesättigt sein (in vivo ist dies allerdings nicht der Fall). Kofaktoren und Aktivatoren müssen in ausreichender Menge vorhanden sein. Hält man die optimalen Bedingungen ein, so muß die Enzymaktivität linear mit der zugesetzten Menge Protein ansteigen.

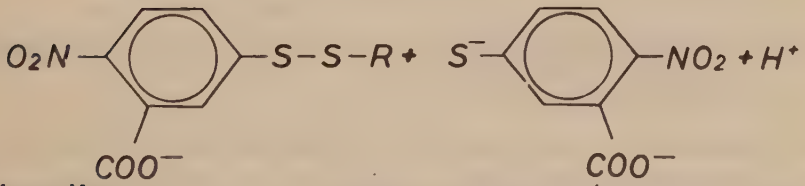
2.2.3. Bestimmung der Citrat-Synthase (EC 4.1.3.7)

Wir bestimmten die Aktivität der Citrat-Synthase nach der von SRERE (1969) beschriebenen Methode. Die Citrat-Synthase katalysiert folgende Reaktion:

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} + H_2O \longrightarrow \text{Citrat}^- + \text{CoA-SH} + H^+$$

Das entstehende Coenzym A wird mit Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB; ELLMANNS Reagens) zur Reaktion gebracht. Es bildet sich dabei ein gemischtes Disulfid; das im Austausch freiwerdende Nitro-Carboxy-Mercaptid hat eine starke Absorption bei 412 nm.





Diese Absorption wird im Spektralphotometer (wir verwendeten ein Gerät der Fa. Beckmann mit Schreiber) bei 25°C ∓ 0,1°C verfolgt. Ihre Zunahme in der Zeiteinheit ist ein direktes Maß für die Aktivität der Citrat-Synthase.

Der Bestimmungsansatz wurde folgendermaßen in Küvetten mit 1 cm Schichttiefe zusammengestellt:

1.) $0{,}1 \times 10^{-4}$ M 5,5-Dithio-bis-(2-Nitro-Benzoesäure)(DTNB)
0,1 ml 1 mM DTNB: 3,9 mg DTNB werden in 10 ml 1 M Tris-Puffer (pH 7,8) gelöst.
Wie in 3.2.1. beschrieben, liegt das Optimum der Enzymaktivität im Euter bei pH 7,8

2.) 3×10^{-4} M Acetyl-CoA
0,03 ml 10 mM Acetyl-CoA: 10 mg CoA + 0,9 ml H_2O +
0,1 ml 1 M $KHCO_3$ + 0,013 ml Essigsäureanhydrid

3.) Cytoplasma: 0,025 bis 0,075 ml

4.) H_2O ad 0,95 ml

Nach Verfolgung der Absorption bei 412 nm (25°C, 3 Min. lang) wird die Reaktion durch Zugabe von

5.) 5×10^{-4} M Oxalacetat gestartet.
0,05 ml 10 mM Oxalacetat: 1,32 mg Oxalessigsäure werden in 1 ml 0,1 M Tris-Puffer (pH 7,8) gelöst

Die Reaktion wird etwa 10 Min. am Schreiber (Schreibgeschwindigkeit 2 inch/Min.) verfolgt. Aus der Steigung der Kurve läßt sich die Aktivität der Citrat-Synthase errechnen.

2.2.4. Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase (NADP-spezifisch, ICDH, EC 1.1.1.4.2)

Die NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase katalysiert die oxydative Decarboxylierung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat (CLELAND, THOMPSON und BARDEN 1969):

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + CO_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow[Mg^{++}od.\ Mn^{++}]{ICDH} \text{Isocitrat} + NADP$$

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt vollkommen auf der linken Seite. Die pro Zeiteinheit dabei umgesetzte Isocitratmenge kann an Hand der Zunahme der Extinktion von NADPH gemessen werden. Sie ist ein direktes Maß für die Aktivität der ICDH. Die Messung erfolgte mit dem Spektralphotometer bei 340 nm und 25°C ∓ 0,1°C.

Der Bestimmungsansatz wurde folgendermaßen in Küvetten von 1 cm Schichttiefe zusammengestellt:

1.) ca. 8×10^{-4} M Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat als Dinatriumsalz (NADP)

2.) Cytoplasma: 0,025 bis 0,075 ml

3.) $6{,}6 \times 10^{-3}$ M $MnSO_4$
0,1 ml 0,1 M $MnSO_4$

4.) Ca. 8×10^{-4} M Triäthanolaminpuffer
0,05 M (pH 7,6) Puffer ad 1,48 ml

Die Extinktion wird solange verfolgt, bis sie konstant bleibt und die Reaktion dann durch Zugabe von

5.) $3{,}3 \times 10^{-4}$ M Isocitrat gestartet.
0,02 ml 0,05 M DL-Isocitrat: 435,0 mg DL-Isocitronensäure-Lacton werden in 10 ml H_2O gelöst, der pH-Wert wird mit 1 N KOH auf 9,0 gebracht (Glaselektrode) und die Lösung 10 Min. im Wasserbad gekocht (pH dabei mit 1 N KOH nach Zusatz von 1 Tropfen Mischindikator über 7 gehalten). Nach Abkühlung wird die Lösung mit 2 N HCl auf pH 7,4 gebracht (Glaselektrode) und mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt.

Die Extinktionszunahme wird am Schreiber einige Minuten lang verfolgt. Aus der Steigung läßt sich die Aktivität der Isocitratdehydrogenase berechnen.

2.2.5. Bestimmung der ATP-Citrat-Lyase (Citrate-Cleavage-Enzyme, EC 4.1.3.8)

Die Aktivität der ATP-Citrat-Lyase kann durch Messung der Zunahme von Acetyl-CoA oder von Oxalacetat bestimmt werden.

$$\text{Citrat} + \text{ATP} + \text{CoA} \xrightarrow[\text{Citrat-Lyase}]{Mg^{++}} \text{Oxalacetat} + \text{Acetyl-CoA} + \text{ADP}$$

Drei Methoden wurden für die Bestimmung verwendet (YOSHIRO TAKEDA, FUJIO SUZUKI und HIDEO INOUE 1969).

1. Bei der Hydroxylaminmethode wird das entstehende Acetyl-CoA mit Hydroxylamin zu Acet-Hydroxamsäure umgesetzt, die dann mit Fe^{3}-Ionen eine charakteristische Färbung ergibt.

Der Bestimmungsansatz wurde folgendermaßen in Reagenzgläsern zusammengestellt:

1.) 0,2 M Tris-Puffer
0,4 ml 0,5 M Tris-Puffer pH 7,4

2.) 0,01 M $MgSO_4$
0,02 ml 0,5 $MgSO_4$

3.) 0,01 M Mercaptoäthanol
0,05 ml 0,2 M Mercaptoäthanol

4.) 0,02 M Na-Citrat
0,1 ml 0,2 M Na-Citrat

5.) 1 x 10^{-4} M CoA
0,05 ml 2 mM CoA
Für den Blindwert werden an Stelle von CoA 0,05 ml H_2O verwendet.

6.) 0,2 M Hydroxylamin
0,1 ml 2 M Hydroxylamin

7.) 0,13 ml H_2O

8.) 0,1 ml Cytoplasma

Die Reagenzgläser werden drei Minuten in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von

9.) 5×10^{-4} M ATP gestartet.
0,05 ml 0,1 M ATP

Nach einer Stunde werden 0,2 ml Trichloressigsäure, 0,8 ml H_2O und 0,3 ml 2 M $FeCl_3$ dazugegeben. Die Färbung des Fe^3-Salzes der Acet-Hydroxamsäure wird bei 520 nm im Spektralphotometer gemessen.

2. Bei der Isotopenmethode wird das Citrat mit 14-C markiert, das gebildete 14-C-Oxalacetat zu 14-CO_2 abgebaut, dieses in Hyaminlösung aufgefangen und die Radioaktivität bestimmt.

Der Bestimmungsansatz wird folgendermaßen in einarmigen Warburgkölbchen zusammengestellt:

1.) 4×10^{-2} M Tris-Puffer
0,2 ml 0,2 M Tris-Puffer pH 8,4

2.) 4×10^{-3} M $MgSO_4$
0,02 ml 0,2 M $MgSO_4$

3.) Mercaptoäthanol (wie in Methode 1)

4.) CoA (wie in Methode 1)

5.) 2×10^{-4} M Citrat
0,1 ml 2 mM Citrat (0,5 µC/µ Mol)

6.) Cytoplasma: 0,1 bzw. 0,2 ml

7.) H_2O ad 0,9 ml

Die Reaktion wird durch Zugabe von

8.) 1×10^{-2} M ATP gestartet.
0,1 ml 0,1 M ATP

Nach ½ Std. Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von

9.) 0,2 ml 0,1 M Oxalacetat in 2 N HCl gestoppt.

In den mittleren Einsatz kommt

10.) 0,2 ml 1 M Hyamin in Methanol

und ein kleiner Papierstreifen. Nach 10 Min. Inkubation bei 25°C wird der Hahn am Manometer geschlossen und

11.) 0,75 M Acetatpuffer mit 33 % $Al_2(SO_4)_3$ eingekippt.

Das Gemisch wird nun 75 Min. bei 25°C geschüttelt, um die gebildete Oxalessigsäure vollständig zu zersetzen. Die Hyaminlösung wird mit 0,5 ml Methanol in Scintillationsgläser gegeben; die Radioaktivität des im Hyamin absorbierten 14-CO_2 wird nun gezählt.

3. Bei der spektralphotometrischen Methode wird das gebildete Oxalacetat mit Malatdehydrogenase bestimmt. Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab:

$$\text{Oxalacetat} + H^+ + \text{NADH} \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Malat} + \text{NAD}$$

Der Bestimmungsansatz wird in Küvetten von 1 cm Schichttiefe folgendermaßen zusammengestellt:

1.) Tris-Puffer (wie in Methode 1)

2.) $MgSO_4$ (wie in Methode 2)

3.) Mercaptoäthanol (wie in Methode 1)

4.) 0,01 M ATP
0,1 ml 0,1 M ATP

5.) Na-Citrat (wie in Methode 1)

6.) 6 x 10^{-4} M Nicotinamid-adenin-dinucleotid
reduzierte Form, di-Natriumsalz (NADH), 0,06 ml
10 mM NADH

7.) 0,01 ml MDH

8.) Cytoplasma: 0,05 bis 0,1 ml

9.) H_2O ad 1,0 ml

Die Reaktion wird durch Zugabe von

10.) 1,4 x 10^{-4} M CoA gestartet.
0,07 ml 2 mM CoA

Die Messung erfolgt im Spektralphotometer bei 37°C und 340 nm. Die Extinktion wird einige Minuten am angeschlossenen Schreiber verfolgt (Schreibgeschwindigkeit 2 inch/Minute).

2.3. Bestimmung von Zwischenstoffkonzentrationen

2.3.1. Gewinnung des Extraktes

Es ist sehr wichtig, Proben von tierischem Gewebe so schnell wie möglich einzufrieren, da sich viele intermediäre Stoffwechselprodukte sehr schnell post mortem in der anoxischen Phase verändern. Um das Gewebe rasch zu fixieren, verwendeten wir eine Flachzange mit Kupferbacken, die in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde (Frierstoppzange nach WOLLENBERGER et al. 1960). Sofort nach der Betäubung des Tieres wurden zwei Schnitte in das Eutergewebe gelegt, so daß eine etwa 1 cm dicke Scheibe entstand. Anschließend wurde die Gewebescheibe bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zeit von der Betäubung der Kuh bis zur Aufbewahrung der Scheibe betrug zwischen 1'30'' und 2'.

Das gefrorene Gewebe wurde dann in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Porzellanmörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Nach Entnahme einer Probe für die Bestimmung von DNS, RNS und Fett (ca. 1 g) wurde der Rest des gepulverten Gewebes mit der doppelten Menge 6 %iger Perchlorsäure unter flüssigem Stickstoff gemischt. Anschließend wurde das Gemisch im Wasserbad bei 30°C halb aufgetaut und im Homogenisator der Firma Bühler kurz homogenisiert, sodaß es am Ende gerade aufgetaut war. Es wurde dann sofort in der Kühlzentrifuge 5 Min. bei 0°C und ca. 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgemessen und mit gesättigter K_2CO_3-Lösung auf pH 6,0 bis 6,5 gebracht. Nach dem Filtrieren wurde das Gemisch im Eisbad 15 Min. stehengelassen und anschließend zentrifugiert. Der Überstand (Extrakt) diente zur Bestimmung der Zwischenstoffkonzentrationen.

Für die Bestimmung von Acetyl-CoA wurde dem Extrakt sofort nach dem Neutralisieren 1 % einer 0,1 M Dithiothreit-Lösung zugesetzt, 5 Min. im Eisbad stehengelassen und zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Bestimmung von Acetyl-CoA verwendet.

2.3.2. Bestimmung von Citrat

Wir bestimmten Citrat mit Hilfe eines enzymatisch-optischen Testes nach MOELLERING und GRUBER (1966). Diese Methode beruht auf der Spaltung des Citrats mit Citrat-Lyase (EC 4.1.3.6) aus A. aerogenes und der Bestimmung des gebildeten Oxalacetats und des daraus durch Decarboxylierung entstehenden Pyruvats mit Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37) und Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27).

Die dabei beteiligten Reaktionen laufen nach folgendem Schema ab:

(1) $\text{Citrat} \xrightleftharpoons{CL} \text{Oxalacetat} + \text{Acetat}$

(2) $\text{Oxalacetat} \xrightarrow[\text{Decarboxylase}]{OA-} \text{Pyruvat} + CO_2$

(3) $\text{Pyruvat} + \text{Oxalacetat} + 2\ \text{NADH} + 2\ H^+ \xrightarrow[MDH]{LDH} \text{Lactat} + \text{Malat} + 2\ NAD^+$

Citratlyase-Präparate aus Aerobacter aerogenes enthalten noch Oxalacetat-Decarboxylase, darüber hinaus wird Oxalacetat auch spontan decarboxyliert. Um sowohl Oxalacetat als auch Pyruvat vollständig zu erfassen, verwendet man als Indikator-Enzyme Malat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase. Die Abnahme der NADH-Konzentration, gemessen an der Abnahme der Extinktion bei 340 nm, ist ein Maß für die umgesetzte Citrat-Menge.

Der Bestimmungsansatz wird folgendermaßen in Küvetten von 1 cm Schichttiefe zusammengestellt:

1.) Extrakt: 0,25 bis 0,75 ml

2.) $1{,}5 \times 10^{-4}$ M NADH
0,03 ml 10 mM NADH

3.) 5×10^{-2} M Tris-Puffer und
5×10^{-3} M $MgSO_4$
1 ml Puffer, der folgendermaßen hergestellt wird:
186,1 mg EDTA werden mit 25 ml eines 0,2 M Tris-Puffers und 2 ml einer 0,5 M $MgSO_4$-Lösung in einem Reagensglas gelöst.

4.) 0,005 ml MDH

5.) 0,005 ml LDH

6.) H_2O ad 2 ml

Der Inhalt der Küvette wird gemischt, die Extinktion abgelesen und die Reaktion mit

7.) 0,01 ml Citrat-Lyase gestartet.
63 mg des Lyophilisats (15 mg Enzymprotein) werden in 3 ml eiskalter Pufferlösung folgender Zusammensetzung gelöst: 6 g Ammoniumsulfat und 4 mg $ZnCl_2$ werden in 100 ml 0,01 M Triäthanolaminpuffer (pH 7,6) gelöst. Die Enzymlösung ist ca. 8 Tage verwendbar.

Nach ca. 10 Minuten stellt sich eine konstante Extinktion ein. Falls vor oder nach Beendigung der Reaktion noch eine Extinktionsänderung beobachtet wird, muß um diese korrigiert werden.

2.3.3. Bestimmung von Isocitrat (mit Isocitrat-Dehydrogenase, EC 1.1.1.42)

Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert die oxydative Decarboxylierung von Isocitrat (WILLIAMSON und CORKEY 1969).

$$\text{Threo-D}_s\text{-Isocitrat} + NADP^+ \xrightarrow[ICDH]{Mn^{++}} \alpha\text{-Ketoglutarat} + CO_2 + NADPH + H^+$$

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt weit rechts. Bei optimalem pH und optimaler Mn^{++}-Konzentration ist die quantitative Umsetzung von Isocitrat möglich. Wegen der geringen Menge Isocitrat im Extrakt wird das gebildete NADPH fluorimetrisch gemessen.

Wir benutzten dazu das Photometer Eppendorf mit Fluoreszenzaufsatz. Die Fluoreszenz wird durch die Hg-Linie bei 366 nm angeregt. Sie ist maximal bei 465 nm. Das Fluoreszenzlicht geht durch ein Filter von 430 - 470 nm.

Der Bestimmungsansatz wird in Küvetten von 1 cm Schichttiefe folgendermaßen zusammengestellt:

1.) 1,25 x 10^{-4} M NADP
0,05 ml 5 mM NADP

2.) 2 x 10^{-4} M $MnSO_4$
0,2 ml 0,02 $MnSO_4$

3.) 0,5 ml und 0,75 ml Extrakt

4.) ca. 5 x 10^{-4} M Tris-Puffer
1 ml bzw. 1,25 ml 0,1 M Tris-Puffer

Der Inhalt wird gemischt und im Fluorimeter gemessen.

Mit einer Standardlösung der folgenden Zusammensetzung wird das Fluorimeter auf 100 geeicht:

0,01 ml NADH (7 mg/1,5 ml)
0,4 ml $NaHCO_3$ (5 %)
ad 2 ml H_2O

Danach wird

5.) 0,005 ml Isocitrat-Dehydrogenase zugegeben,

gemischt und erneut gemessen. Nach 3 Min. ist die Zunahme der Fluoreszenz beendet, da Isocitrat quantitativ in α-Ketoglutarat verwandelt wird.

Als Standard werden jedesmal zwei bekannte Mengen Isocitrat (siehe 2.1.4.) mitgemessen.

Isocitrat-Standardlösung: Nach unseren Erfahrungen war die Hydrolyse des Isocitronensäurelactons nicht quantitativ, sodaß der Gehalt der Lösung an Isocitrat im Photometer Eppendorf mit Filter Hg 366 mit ICDH bestimmt werden mußte.

2.3.4. Bestimmung von Acetyl-Coenzym A

Für die Bestimmung von Acetyl-CoA verwendeten wir einen zusammengesetzten enzymatisch-optischen Test nach BUCKEL und EGGERER (1965) sowie PEARSON (1965).

Prinzip:

(1) Acetyl-S-CoA + Oxalacetat + H_2O $\xrightarrow{CS}$ Citrat + CoASH

(2) Malat + NAD^+ $\xrightarrow{MDH}$ Oxalacetat + NADH + H^+

---

(3) Malat + Acetyl-S-CoA + NAD^+ + H_2O $\longrightarrow$ Citrat + NADH + H^+ + CoASH

Citrat-Synthase katalysiert die Reaktion (1). Es ist dazu Oxalacetat nötig, das durch die Oxydation von Malat geliefert wird (2). Für diese Reaktion, die als Indikatorreaktion vorgeschaltet wird, wird MDH als Hilfsenzym benötigt. Das Gleichgewicht der Indikatorreaktion (2) liegt weit auf der Seite der Reduktion von Oxalacetat, das der Bestimmungsreaktion (1) aber so weit auf der Seite der Synthese von Citrat, daß auch die zusammengesetzte Reaktion (3) praktisch vollständig von links nach rechts abläuft. Das entstehende NADH (3) wird mit Hilfe der Extinktionsänderung bei 340 nm im Spektralphotometer gemessen. Allerdings bildet sich nicht so viel NADH als der Menge des im Extrakt vorhandenen Acetyl-CoA entspricht; das Acetyl-CoA kann jedoch unter bestimmten Voraussetzungen aus der NADH-Zunahme berechnet werden. Dabei geht sowohl die Extinktionszunahme nach Zugabe von MDH als auch nach Zugabe von Citrat-Synthase in die Berechnung ein.

Der Bestimmungsansatz wird in Mikroküvetten von 1 cm Schichttiefe folgendermaßen zusammengestellt:

1.) 0,2 M Tris-Puffer
0,2 ml 1 M Tris-Puffer pH 7,8

2.) 0,02 M Malat
0,1 ml 0,1 M DL-Malat: 268 mg Äpfelsäure werden in 5 ml H_2O gelöst, mit KOH auf pH 7,0 gebracht und mit H_2O auf 10 ml aufgefüllt. Da die Lösung meist geringe Spuren von Oxalacetat enthält (BUCKEL und EGGERER 1965) muß sie entweder jedesmal neu gemacht werden oder zur Vertreibung der Oxalessigsäure ausgekocht werden.

3.) 5×10^{-4} M Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD), freie Säure
0,05 ml 10 mM NAD: 66,35 mg NAD in 10 ml H_2O lösen. Die Säure muß sofort nach der Lösung mit 2 N NaOH neutralisiert werden.

4.) Extrakt: 0,25 und 0,5 ml

5.) H_2O ad 1 ml

Der Küvetteninhalt wird gemischt und die Extinktion (E_1) gegen Wasser abgelesen. Dann wird

6.) 0,05 ml MDH

zugegeben und die Extinktion (E_2) gemessen; schließlich wird die Extinktion (E_3) nach Zugabe von

7.) 0,01 ml Citrat-Synthase

bestimmt. Gemessen wird in einem Spektralphotometer bei 340 nm.

Da bei dieser Bestimmungsmethode durch die vorgeschaltete Indikatorreaktion keine direkte Stöchiometrie zwischen der umgesetzten Acetyl-CoA-Menge und der gemessenen NADH-Zunahme besteht (BUCKEL und EGGERER, PEARSON 1965) gilt folgende Formel für die Berechnung der Acetyl-CoA-Menge (BUCKEL):

$$C = \frac{\Delta E_2 \times V}{\varepsilon \times d} \quad \left(1 + \frac{\Delta E_1}{\Delta E_1 + \Delta E_2} \right)$$

C = Konzentration von Acetyl-CoA (μMol/ml Probe)

$\Delta E_1 = E_2 - E_1$

$\Delta E_2 = E_3 - E_2$

V = Volumen im Testansatz

$\varepsilon_{NADH} = 6{,}22$ (bei 340 nm)

d = Schichtdicke der Küvette

da V = 1,015 ml und d = 1 cm ist, gilt:

$$C = \frac{\Delta E_2 \times 1{,}015}{6{,}22 \times v} \quad \left(1 + \frac{\Delta E_1}{\Delta E_1 + \Delta E_2} \right)$$

v = Probevolumen im Test

2.4. Untersuchungen zur Kontrolle der Euterproben

Die Frage einer zuverlässigen Kontrolle für den Zustand der jeweiligen Euterprobe ist besonders wichtig, wenn man von dem heterogenen Tiermaterial des Schlachthofs ausgeht.

Im Cytoplasma, das zur Messung der Enzymaktivitäten diente, wurde der Proteingehalt bestimmt.

An der identischen Euterprobe, an der auch die Zwischenstoffkonzentrationen bestimmt wurden, führten wir folgende Untersuchungen durch:
Bestimmung von Laktose als Maß für den Milchgehalt
Bestimmung von DNS als Maß für die Zellzahl
Bestimmung von RNS als Maß für die mitotische Aktivität
Bestimmung des Fettgehaltes

An einer paralellen Probe des gleichen Euterviertels wurde der Anteil an Drüsen-, Fett- und Bindegewebe nach histologischer Aufarbeitung und Anfärbung mit Hämatoxilin-Eosin abge-

schätzt.

Bei Kühen mit hohem Bindegewebsanteil im Euter wurde zur quantitativen Erfassung des Bindegewebsanteils der Kollagengehalt bestimmt.

2.4.1. Laktosebestimmung

Die Laktose wird in demselben Extrakt, der auch zur Bestimmung der Zwischenstoffkonzentrationen verwendet wurde, bestimmt, und zwar nach einem kolorimetrischen Verfahren (MARIER, BOULET 1959). Geeignete Mengen Extrakt, die durch Vorversuche ermittelt werden, werden mit H_2O ad 2 ml aufgefüllt und mit 0,1 ml Phenollösung (80 g Phenol in 20 ml H_2O gelöst) versetzt. Dazu werden 6,0 ml konzentrierter H_2SO_4 pipettiert und sofort gut durchgeschüttelt. Nach Abkühlung wird die Lösung im Eppendorf mit Filter Hg 492 und bei 1 cm Schichttiefe gegen H_2O gemessen. Bei jeder Bestimmung werden zwei Blindwerte (H_2O) und zwei Eichwerte mit bekannten Laktosemengen mitgemessen.

2.4.2. Bestimmung von DNS, RNS und Fett

Diese Bestimmung wurde im allgemeinen nur in der unter flüssigem Stickstoff gemörserten, auch zur Bestimmung der Zwischenstoffkonzentrationen verwendeten Euterprobe durchgeführt. Da bei Kalbinnen das Euter besonders heterogen war, wurde hier zusätzlich eine Bestimmung von DNS (zur Berechnung der auf DNS bezogenen Enzymaktivitäten) aus einem aliquoten Teil des im Gerät nach Potter-Elvehjem hergestellten Homogenats (siehe 2.1.1.) durchgeführt. Das Homogenat wurde hierbei direkt mit 30 ml Äthanol:Äther versetzt und wie im folgenden beschrieben weiter extrahiert.

2.4.2.1. Extraktion des Fettes

Ca. 1 g der fein gemörserten Probe (siehe 2.2.1.) wird sofort nach dem Auftauen im Homogenisator der Fa. Bühler, Tübingen, mit 10 ml H_2O homogenisiert. Mit 30 ml Äthanol:Äther (3:1) wird das Gemisch in ein Zentrifugenglas überspült und 5 Min. bei 70°C im Wasserbad gekocht. Der Überstand wird in einen vorher genau gewogenen, trockenen Schliffkolben abgegossen und am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird nochmals mit 30 ml Äthanol:Äther (3:1; 70°C; 5 Min.) und anschließend zweimal mit je 20 ml Äther (40°C; 5 Min.) extrahiert. Alle Überstände werden im gleichen Kolben eingedampft, der Kolben wird über P_2O_5 getrocknet und bis zum konstanten Gewicht gewogen. Die Differenz zwischen Leergewicht und Endgewicht gibt die Menge Fett (in g) an. Aus dem Rückstand im Zentrifugenglas wird nach der Trocknung DNS und RNS extrahiert.

2.4.2.2. Extraktion von DNS und RNS (MUNRO und FLECK 1966)

Die Lösung wird einmal mit 15 ml 2 % $HClO_4$ 20 Min. im Eisbad unter Umrühren und zweimal mit je 10 ml 10 % $HClO_4$ 10 Min. im Wasserbad bei 70°C unter Umrühren extrahiert. Jeder Extrakt wird zentrifugiert (5 Min. bei 9000 g) und der Überstand durch einen Trichter mit Watte in ein Meßkölbchen abgegossen. Die vereinigten Überstände werden mit H_2O zur Marke aufgefüllt. Je ein aliquoter Teil dieses Extraktes wird zur Bestimmung von DNS und RNS verwendet.

2.4.2.3. Bestimmung von DNS nach BURTON (1956) (abgewandelte Diphenylaminreaktion nach DISCHE auf Desoxyribose)

Zu 1 ml DNS-haltiger Lösung (0,02 bis 0,25 Mol DNS-P/ml) werden 2 ml Diphenylaminreagens gegeben. Die Lösung von 1,5 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig + 1,5 ml konz. H_2SO_4 muß dunkel aufbewahrt werden; 20 ml derselben werden jedesmal neu mit 0,1 ml Acetaldehydlösung versetzt (16 mg frischdestil-

liertes Acetaldehyd in 1 ml H_2O). Die Proben werden zur Entwicklung der blauen Farbe 16 bis 20 Std. bei 30°C stehengelassen (H_2O-Bad). Diese wird im Spektralphotometer bei 600 nm und 1 cm Schichttiefe gegen H_2O gemessen.

2.4.2.4. Bestimmung von RNS mit Orcin (Farbreaktion für Ribose und Riboside, CERIOTTI 1955)

Ein aliquoter Teil des Extraktes wird mit H_2O auf 5 ml aufgefüllt. Dazu werden 5 ml Cu-Orcinlösung (200 mg Orcin + 10 ml 0,004 M $CuCl_2$/100 ml konz. HCl) gegeben; nach 40 Min. im siedenden Wasserbad wird mit 5 ml Amylalkohol extrahiert. Die Messung erfolgt bei 672 nm und 1 cm Schichttiefe im Spektralphotometer gegen Amylalkohol.

2.4.3. Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode

Aus 0,5 ml bzw. 0,8 ml des Cytoplasmas werden nach Auffüllen auf 0,9 ml mit Aqua dest. die Proteine mit 0,1 ml 3 M Trichloressigsäure gefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und die Zentrifugengläser mit der Öffnung nach unten auf Filterpapier gestellt, um Überstandsreste abtropfen zu lassen. Nun wird der Niederschlag mit 4,9 ml Aqua dest. aufgerührt und mit 5 ml Biuretreagens gemischt, das wie folgt hergestellt wird: In etwa 400 ml carbonatfreier 0,2 N NaOH werden 9,0 g Kalium-Natriumnitrat (Seignettesalz) und 3,0 g feinst gepulvertes $CuSO_4$ gelöst. Erst nach völliger Lösung werden 5,0 g KJ zugegeben und mit 0,2 N NaOH auf 1000 ml aufgefüllt.

Die Proben werden zur Entwicklung der violetten Farbe mindestens 30 Min. stehen gelassen. Die Messung erfolgt am Photometer Eppendorf mit Filter Hg 546 und bei 2 cm Schichttiefe. Durch Multiplikation der Extinktion mit dem Faktor 17 erhält man die Menge Protein in der Probe.

2.5. Berechnung der Meßergebnisse

Für photometrische Messungen (innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereiches) gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$C = \frac{E}{\varepsilon \times d} \quad \mu\text{Mol/ml} \quad \text{(im Testansatz)}$$

Daraus ergibt sich für die chemische Umsetzung:

$$C = \frac{E \times V}{\varepsilon \times d \times v} \quad \mu\text{Mol/ml} \quad \text{(in der Probe)}$$

C = Konzentration μMol/ml
E = Extinktion
= molarer Extinktionskoeffizient cm^3/μMol
d = Schichtdicke cm
V = Testvolumen ml
v = Probenvolumen im Test ml

Bei Bezug auf einen Standardwert gilt:

$$C = \frac{C \text{ Probe (gemessen)}}{C \text{ Standard (gemessen)}} \times C_{\text{Standard (Einwaage)}}$$

Im allgemeinen gibt man bei Metaboliten das Meßergebnis als Konzentration (μMol pro Volumeneinheit der Probe) an oder man bezieht auf Gewichtseinheit (μ Mol/Gewichtseinheit). Bei biologischem Material (Gewebe) bezieht man auf das Frischgewicht des Gewebes.

Für die Umrechnung auf Frischgewicht (g Euter) muß noch mit einem Faktor f multipliziert werden. Dieser errechnet sich aus (siehe 2.2.1.) 1. dem Flüssigkeitsgehalt des Euters, der mit 75 % angenommen wird, 2. der zweifachen Verdünnung mit 6 % $HClO_4$ (= 2,75), 3. Der Menge des Extraktes nach dem Zentrifugieren (a) und der Menge des verbrauchten K_2CO_3 (b); es gilt: a:(a+b) = 2,75:f.

Die Aufzeichnung der Extinktionsänderung bei der Messung der Enzymaktivität erfolgte mit einem Schreiber, der an das Spektralphotometer angeschlossen war. Aus der Steigung der Kurven konnte die Enzymaktivität pro Volumeneinheit errechnet werden. Es gilt:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{V}{\varepsilon \times d \times v} \quad \Delta E / \Delta t \quad \text{m U/ml (in der Probe)}$$

2.6. Auswertung der Meßergebnisse (LUIGI CAVALLI-SFORZA 1964)

Die Streuung wurde folgendermaßen berechnet:

$$S = \sqrt{\frac{S\,(x - m)^2}{n - 1}}$$

Für den Vergleich der Mittelwerte wurde der Signifikanztest (t-Test) nach Student angewandt.

$$t = \frac{m_A - m_B}{S} \times \sqrt{\frac{n_A \times n_B}{n_A + n_B}}$$

$$S = \sqrt{\frac{S\,(x_A - m_A)^2 + S\,(x_B - m_B)^2}{n_A + n_B - 2}}$$

x_A symbolisiert die Stichprobenwerte aus A
x_B symbolisiert die Werte aus B

3. Ergebnisse

3.1. Kontrolluntersuchungen

In dem uns zur Verfügung stehenden Tiermaterial (siehe 2.1.) bildeten Kalbinnen eine besondere Gruppe (Gruppe 1). Deren Euter enthielt histologisch im Durchschnitt etwa 30 % Fettgewebe, wobei Werte bis zu 50 % noch mitverwertet wurden. Der gravimetrisch bestimmte Fettgehalt und der histologisch ermittelte Anteil an Fettgewebe waren meist in der gleichen Größenordnung.

Nach den in unseren Kontrolluntersuchungen in den Euterproben ermittelten Werten (Laktose, DNS und RNS) teilten wir die übrigen Tiere in drei weitere Gruppen ein:

Gruppe 2 bestand aus laktierenden Tieren mit 35,5 bis 55,5 % Milch im Euter, 6 bis 9 mg DNS und einem RNS/DNS-Quotienten von 0,3 bis 0,8. Der Anteil an Drüsengewebe lag histologisch über 85 %, der Rest bestand vorwiegend aus Fettgewebe.

Bei den Tieren der Gruppe 3 hatte das Euter einen Milchgehalt von 5,5 bis 35,5 %, es enthielt 10 bis 15 mg DNS und hatte einen RNS/DNS-Quotienten von 0,2 bis 0,35. Das Euter enthielt 70 bis 85 % Drüsengewebe, 9 % Fettgewebe und 10 bis 20 % Bindegewebe.

In Gruppe 4 wurden trockenstehende Kühe, die im Euter praktisch keine Milch, dagegen 15 bis 20 mg DNS und einen RNS/DNS-Quotienten von 0,1 bis 0,25 hatten, zusammengefaßt. Das Euter enthielt 50 bis 70 % Drüsengewebe und bis zu 40 % Bindegewebe.

Außerdem wurden die Werte von Tieren, bei denen nachträglich ein Foetus festgestellt wurde, von Tieren mit zu hohem Fettgehalt im Euter (Kalbinnen), von Tieren mit pathologischen Befunden (Ödem, Mastitis) im Euter sowie Tiere mit abnormen Werten, bei denen rein äußerlich kein pathologischer Befund fest-

zustellen waren, nicht berücksichtigt.

In der Tabelle 1 sind die von uns in den Kontrolluntersuchungen bestimmten Werte für die einzelnen Gruppen angegeben. Bei Milch, Protein und Fett sind die höchsten und niedrigsten Werte angegeben, da es hier nicht sinnvoll war, die mittlere Streubreite zu berechnen. Bei Kalbinnen war der im Homogenat bestimmte Wert für DNS höher als der aus einer benachbarten Euterprobe.

Tab. 1 Meßwerte der Kontrolluntersuchungen an verschiedenen Euterproben

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Milch %	---	50,30 26,42-60,57	17,41 7,77-31,47	---
mg DNS / g Euter	14,74± 4,05	6,98± 1,44	10,09± 2,88	15,42± 3,62
mg RNS / g Euter	2,84± 0,52	2,93± 0,77	3,35± 0,79	3,26± 0,73
mg RNS / mg DNS	0,200±0,039	0,422±0,084	0,346±0,087	0,215±0,035
Protein mg/ml	6,0 3,9 -13,5	15,6 5,8 -19,0	9,2 4,8 -16,9	6,7 3,9 -14,4
Fett % Frisch-gewicht	33,2 14,3 -50,0	12,5 9,2 -18,8	9,0 5,7 -11,7	8,8 4,3 -25,8

Da uns eine Einteilung der Euterproben allein auf Grund des im Euter verbliebenen Milchgehaltes zu unsicher erschien, haben wir noch zusätzlich den Quotienten RNS/DNS herangezogen, der ja ein Maß für die Zahl der Mitosen darstellt (siehe 2.3.). Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, ist der RNS/DNS-Quotient bei

trockenstehenden Tieren nur halb so hoch wie bei laktierenden, bei Kalbinnen und trockenstehenden Tieren etwa gleich hoch, da keine zusätzliche Zellteilung stattfindet. Der DNS-Gehalt, der ein Maß für die Zellzahl darstellt (siehe 2.3.), verhält sich wie zu erwarten umgekehrt proportional dem Milchgehalt des Euters. Er ist bei trockenstehenden Kühen doppelt so hoch wie bei laktierenden. Berechnet man in Gruppe 2 und 3 die Menge DNS/g Euter nach Abzug des Milchgehaltes, so ergibt sich für alle vier Gruppen innerhalb der Fehlergrenzen der gleiche Wert für den DNS-Gehalt.

Auf Grund des Milchgehaltes bzw. des RNS/DNS-Quotienten unterschieden wir bei laktierenden Kühen zwischen der Gruppe 2 und Gruppe 3. Wir nahmen an, daß die Tiere, die wir der Gruppe 2 zuteilten, auf dem Höhepunkt der Laktation standen, während bei den Tieren, die wir der Gruppe 3 zuteilten, die Laktation mehr dem Ende zuging.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Werte u.a. pro g Euter angegeben. Bei diesen Werten wurde der prozentuale Milchgehalt (bei Gruppe 2 und 3) und wenn angegeben, auch der prozentuale Fettgehalt (bei Gruppe 1) der Euterproben vor der Berechnung abgezogen.

3.2. Enzymaktivitäten

3.2.1. Citrat-Synthase

In Vorversuchen bestimmten wir für die einzelnen untersuchten Enzyme im Kuheuter das pH-Optimum, die Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration bei konstanter Enzymmenge, und die Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymmenge bei im übrigen konstanten und optimalen Bedingungen. Der optimale pH-Wert der Citrat-Synthase lag im Kuheuter bei pH 7,8. Alle in Tabelle 2 angeführten Versuche wurden daher bei diesem pH-Wert durchgeführt.

Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, nimmt die Aktivität ab 100 nMol Acetyl-CoA kaum noch zu. Das Enzym ist in diesem Bereich mit Acetyl-CoA gesättigt. Für unsere Messungen verwendeten wir 300 nMol Acetyl-CoA pro ml Inkubationslösung.

Der Verlauf der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Oxalacetat-Konzentration ist aus Abb. 2 zu ersehen. Die von uns für alle Versuche in Tab. 2 gewählte Menge von 500 nMol Oxalacetat/ml Inkubationslösung liegt sehr gut im Sättigungsbereich der Kurve von Abb. 2.

Die Enzymmenge wählten wir so, daß sie nicht höher als in Abb. 1 und 2 war und die Extinktion durch den an das Spektralphotometer angeschlossenen Schreiber gut ablesbar war. Es wurden meist 0,025 und 0,075 ml Eutercytoplasma verwendet. Wie aus Abb. 2a zu ersehen ist, verlief die Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymmenge in diesem Bereich linear.

Die Bestimmung wurde nur im Cytoplasma durchgeführt, da wir in den Mitochondrien keine Aktivität nachweisen konnten. Für Kalbinnen konnten wir das Cytoplasma unverdünnt verwenden, während wir bei den anderen Tieren das Cytoplasma 1:2 mit Tris-Puffer verdünnen mußten, da sonst die Extinktion bei 412 nm (siehe 2.1.3.) zu rasch anstieg und am Schreiber nicht mehr gut ablesbar war.

Abb. 1: Abhängigkeit der Aktivität der Citrat-Synthase von der Konzentration an Acetyl-CoA. Die Reaktionslösung (1 ml) enthielt außerdem 1 µ Mol DTNB, 0,1 Mol Trispuffer pH 7,8, 500 nMol Oxalacetat und 0,0117 mg Protein aus Eutercytoplasma.

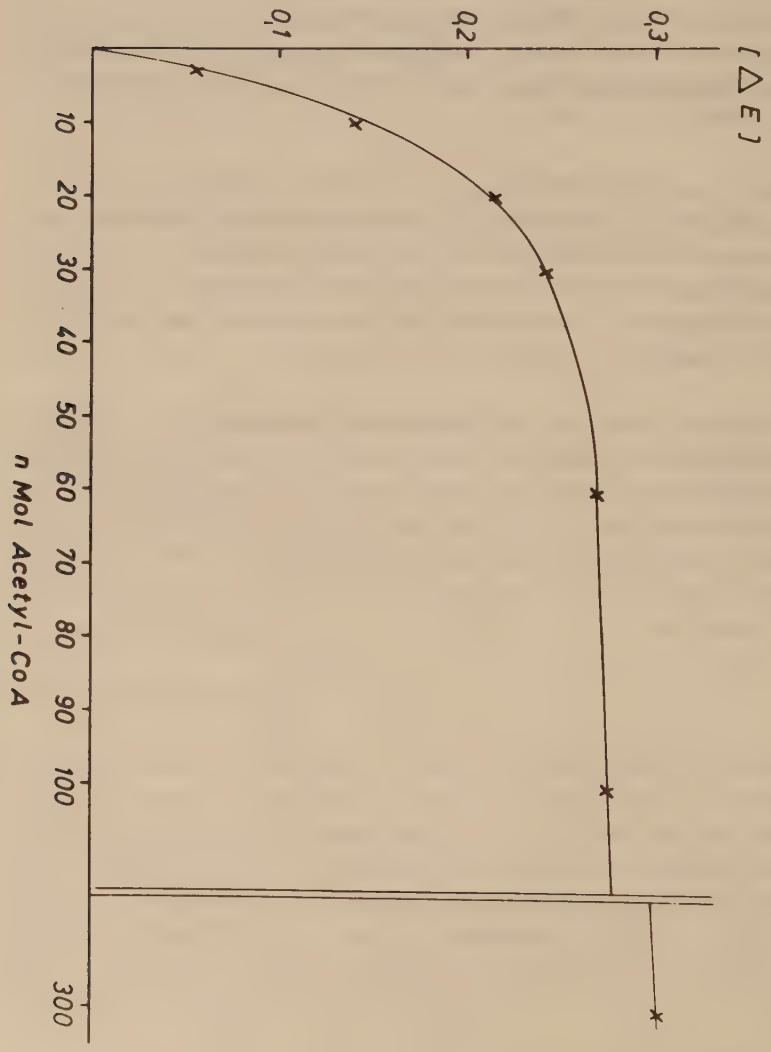


Abb. 2: Abhängigkeit der Citrat-Synthase von der Konzentration an Oxalacetat. Die Reaktionslösung (1 ml) enthielt außerdem 300 nMol Acetyl-CoA, 1 µ Mol DTNB, 0,1 Mol Trispuffer ph 7,8 und 0,0117 mg Protein aus Eutercytoplasma

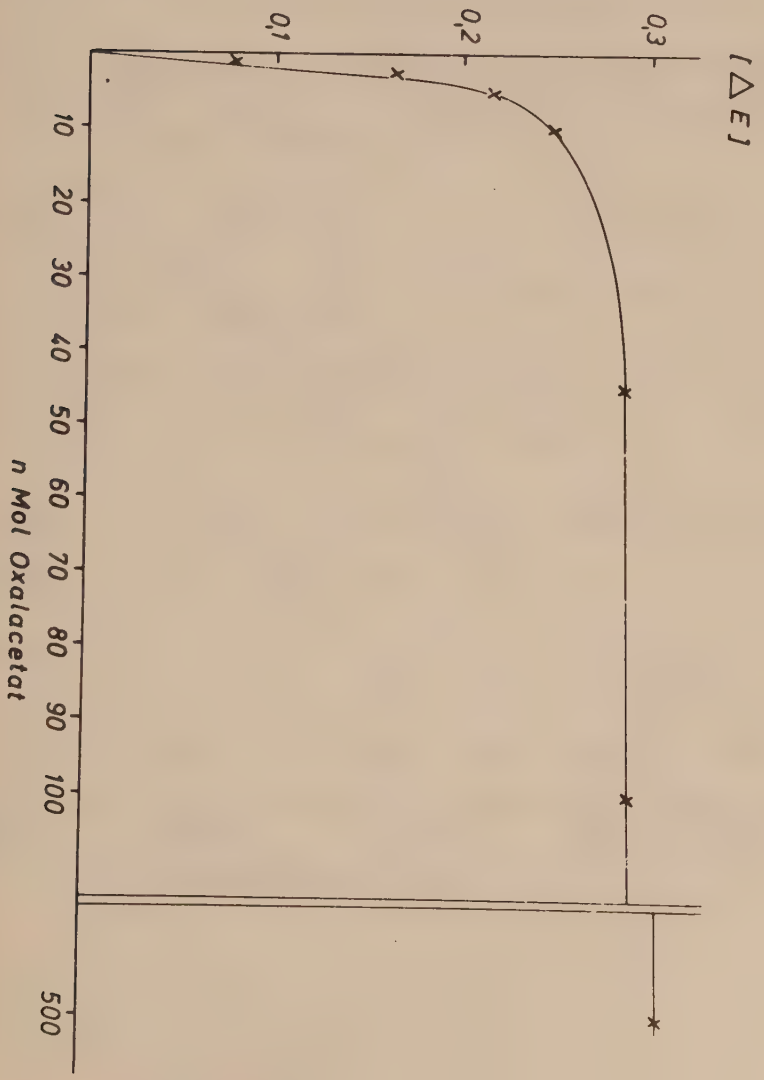
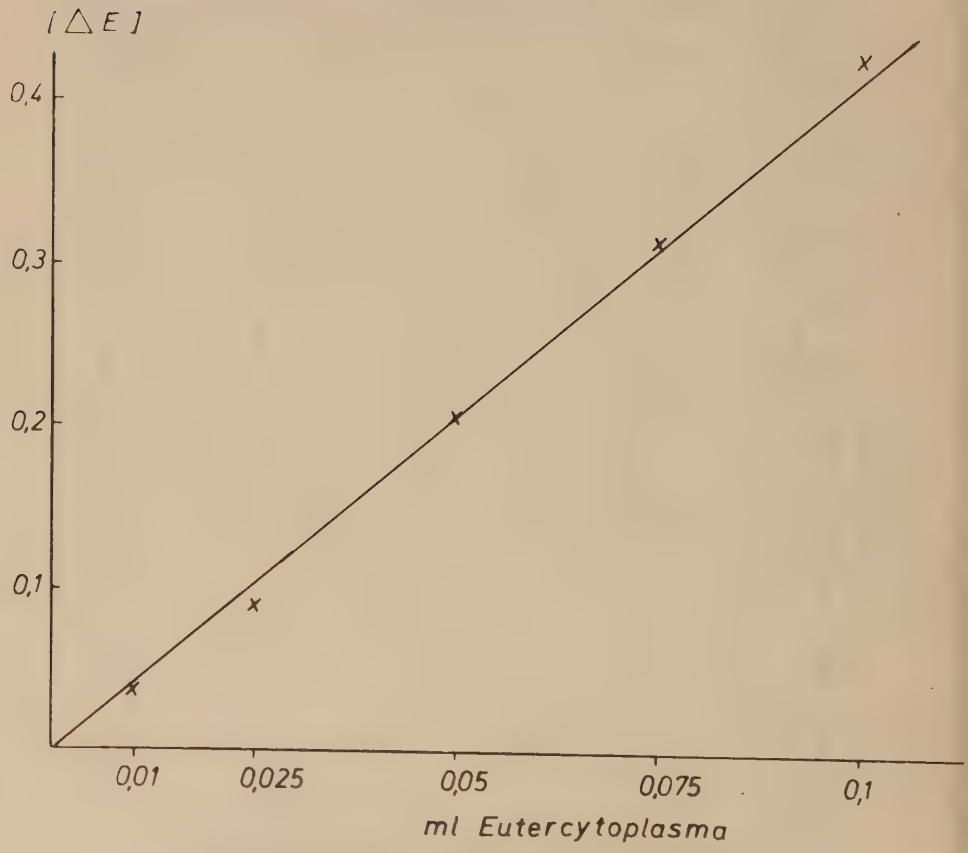


Abb. 2a: Abhängigkeit der Citrat-Synthase von der Enzymmenge. Die Reaktionslösung enthielt außerdem 1 µ Mol DTNB, 0,1 Mol Trispuffer pH 7,8, 500 nMol Oxalacetat und 300 nMol Acetyl-CoA.



Die Aktivität der Citrat-Synthase in verschiedenen Laktationsstadien ist in der Tab. 2 angegeben. Die Zunahme von Kalbinnen zu hoch laktierenden Kühen ist hoch signifikant ($P < 0,001$). Je nach Bezugsgröße ist die Zunahme unterschiedlich: die Aktivität nimmt bei E/mg DNS um den Faktor 5,6 bei E/g Euter um den Faktor 4 und bei E/mg Protein um den Faktor 1,3 zu.

Tab. 2 Aktivität der Citrat-Synthase im Cytoplasma der Euterproben von Kühen in verschiedenen Laktationsstadien (Versuchsbedingungen siehe 2.1.3.)

E = Einheit = die Menge Enzym, die in 10 Minuten bei 25°C 1 µMol Citrat oxydiert

Die Zahlen in Klammern hinter der Gruppen-Nr. geben die Anzahl der untersuchten Tiere an

Der bei Gruppe 1 in Klammern angeführte Wert wurde um den Fettgehalt des Euters korrigiert

Zur Bedeutung von Gruppe 1 bis Gruppe 4 siehe 3.1.

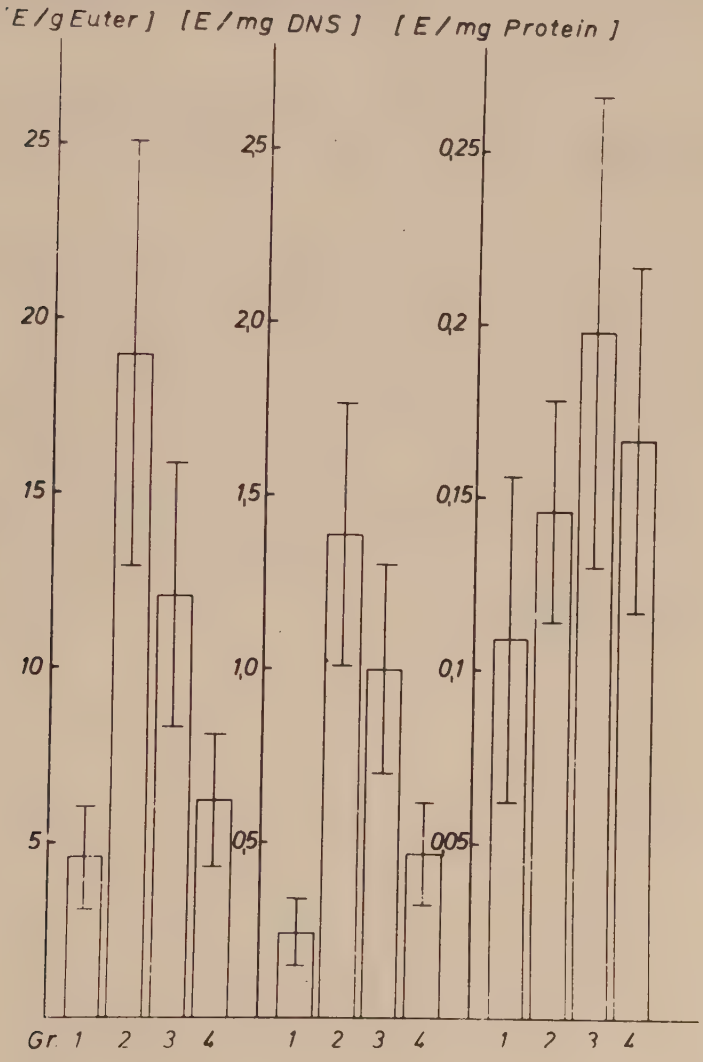
	E/g Euter	E/mg DNS	E/mg Protein
Gruppe 1 (9)	3,500 ± 0,914 (4,611 ± 1,429)	0,246 ± 0,098	0,109 ± 0,047
Gruppe 2 (17)	19,003 ± 6,095	1,390 ± 0,377	0,146 ± 0,032
Gruppe 3 (9)	12,123 ± 3,836	1,012 ± 0,310	0,198 ± 0,068
Gruppe 4 (12)	6,207 ± 1,915	0,467 ± 0,139	0,167 ± 0,050

Tab. 3 P-Werte nach der Student-Verteilung zu den Werten in Tabelle 2

	E/g Euter	E/mg DNS	E/ mg Protein
Gruppe 1 - 2	$<0,001$	$<0,001$	0,05 - 0,025
Gruppe 1 - 3	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$
Gruppe 1 - 4	0,05 - 0,025	0,01 - 0,005	0,02 - 0,01
Gruppe 2 - 3	0,005	0,02 - 0,01	$<0,001$
Gruppe 2 - 4	$<0,001$	$<0,001$	0,3 - 0,2
Gruppe 3 - 4	$<0,001$	$<0,001$	0,3 - 0,2

Zwischen Kalbinnen und trockenstehenden Kühen konnten wir eine deutliche Veränderung bei allen Bezugsgrößen feststellen. Die Unterschiede zwischen der Gruppe 2 und 4 bzw. der Gruppe 3 und 4 waren nur bei Bezug auf mg DNS und g Euter signifikant, während bei Bezug auf mg Protein kein deutlicher Unterschied auftrat. Die Verhältnisse werden in Abb. 3 dargestellt.

Abb. 3: Aktivität der Citrat-Synthase in verschiedenen Laktationsstadien. Zur Bedeutung von Gruppe 1 bis 4 siehe 3.1.



3.2.2. Isocitratdehydrogenase

Das von uns ermittelte pH-Optimum für die Aktivität der Isocitratdehydrogenase im Kuheuter lag zwischen 7,6 und 7,7. Wir wählten bei den in Tab. 4 zusammengefaßten Versuchen stets einen Triäthanolaminpuffer pH 7,6.

Wie in Abb. 4 zu sehen ist, war ab 300 µ Mol Isocitrat im ml das Enzym mit Substrat gesättigt. Unser Bestimmungsansatz enthielt 335 µ Mol Isocitrat im ml.

Die enzymatische Aktivität der von uns verwendeten Mengen von 0,025 und 0,075 ml Eutercytoplasma stieg linear mit der Enzymmenge an (Abb. 4a). In den Mitochondrien konnten wir keine Aktivität nachweisen. Die Bestimmungen wurden daher nur mit Cytoplasma durchgeführt. Dieses mußten wir bei hoch laktierenden Kühen mit Triäthanolaminpuffer im Verhältnis 1:2 verdünnen, damit die Extinktion mit dem Schreiber ablesbar war, während wir für die übrigen Gruppen das Cytoplasma unverdünnt verwenden konnten. Die Werte mit Zusatz von 0,1 M $MnSO_4$ zur Inkubationslösung lagen um 30 % höher als die Werte, bei denen wir 0,1 M $MgSO_4$ verwendeten. Für die in Tab. 4 dargestellten Werte benützten wir deshalb $MnSO_4$.

Abb. 4: Abhängigkeit der Aktivität der Isocitratdehydrogenase von der Konzentration an Isocitrat. Die Reaktionslösung (1,5 ml) enthielt außerdem 6,6 µ Mol $MnSO_4$, 80 µ Mol Triäthanolaminpuffer pH 7,6, 80 µ Mol NADP und 0,0096 mg Protein aus Eutercytoplasma.

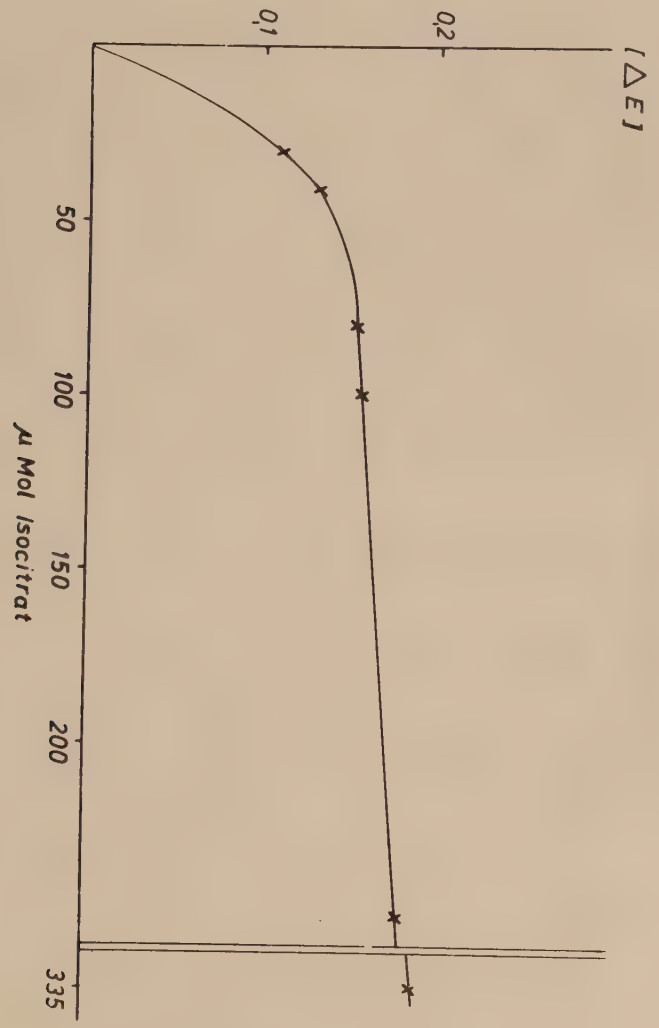
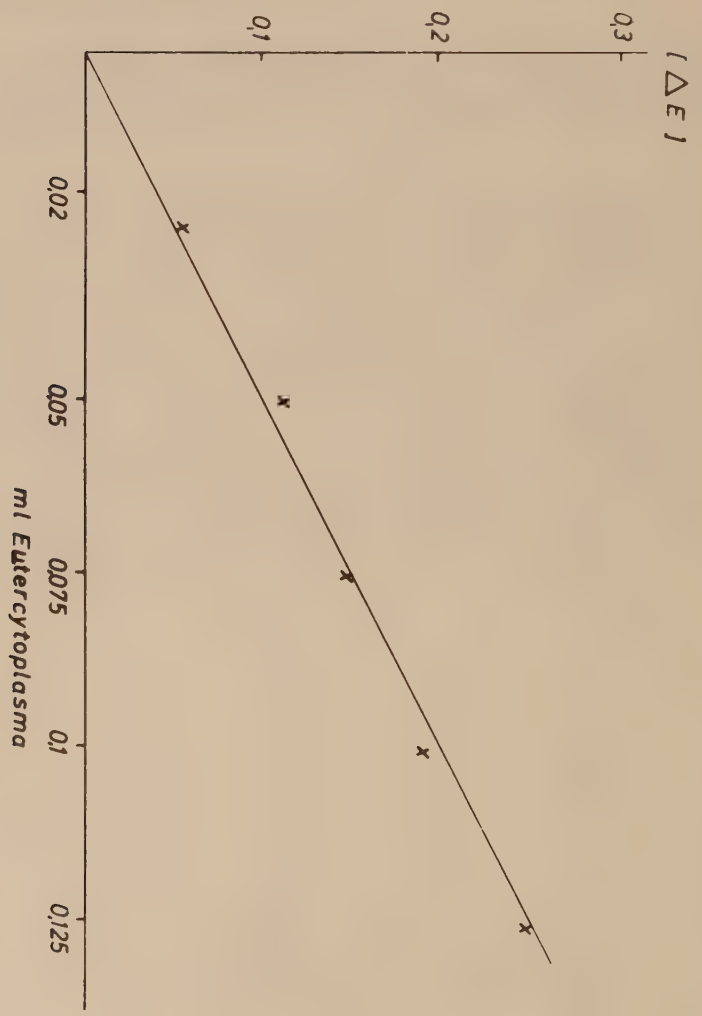


Abb. 4a: Abhängigkeit der Aktivität der Isocitratdehydrogenase von der Enzymmenge. Die Reaktionslösung enthielt außerdem 6,6 µ Mol $MnSO_4$, 80 µ Mol Triäthanolaminpuffer pH 7,6, 80 µ Mol NADP und 330 µ Mol Isocitrat.



Die Ergebnisse für die Aktivität der Isocitratdehydrogenase in den einzelnen Laktationsstadien wurden in Tab. 4 zusammengefaßt. Die Aktivität nahm von Kalbinnen zu gut laktierenden Kühen bei allen Bezugsgrößen signifikant zu ($P < 0{,}001$). Bei Bezug auf g Euter war die Aktivität bei laktierenden Kühen 16mal bei Bezug auf mg DNS 17mal und bei Bezug auf mg Progein 4mal so hoch wie bei Kalbinnen.

Zwischen Kalbinnen und der Gruppe 3 waren ebenfalls bei allen Bezugsgrößen noch signifikante Unterschiede feststellbar. Dagegen konnten wir zwischen Kalbinnen und trockenstehenden Kühen nur bei Bezug auf mg DNS eine Veränderung feststellen, während bei Bezug auf mg Protein und g Euter keine Veränderungen auftraten. Vergleicht man die Enzymaktivität der Gruppe 2 und 3, so fällt auf, daß bei Bezug auf mg Protein kein Unterschied vorhanden ist, bei Bezug auf g Euter und mg DNS die Aktivität von Gruppe 2 zu Gruppe 3 aber deutlich abnimmt. Zwischen laktierenden Kühen (Gruppe 2 und 3) und nicht laktierenden Kühen (Gruppe 4) konnten wir bei allen Bezugsgrößen signifikante Veränderungen feststellen ($P < 0{,}001$). Diese Verhältnisse wurden auch in Abb. 5 dargestellt.

Tab. 4 Aktivitäten der Isocitratdehydrogenase im Cytoplasma des Kuheuters in verschiedenen Laktationsstadien

E = Einheit = die Menge Enzym, die in einer Minute bei 25°C 1 µ Mol Isocitrat oxydiert

In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben

Der bei Gruppe 1 in Klammern angegebene Wert wurde um den Fettgehalt des Euters korrigiert

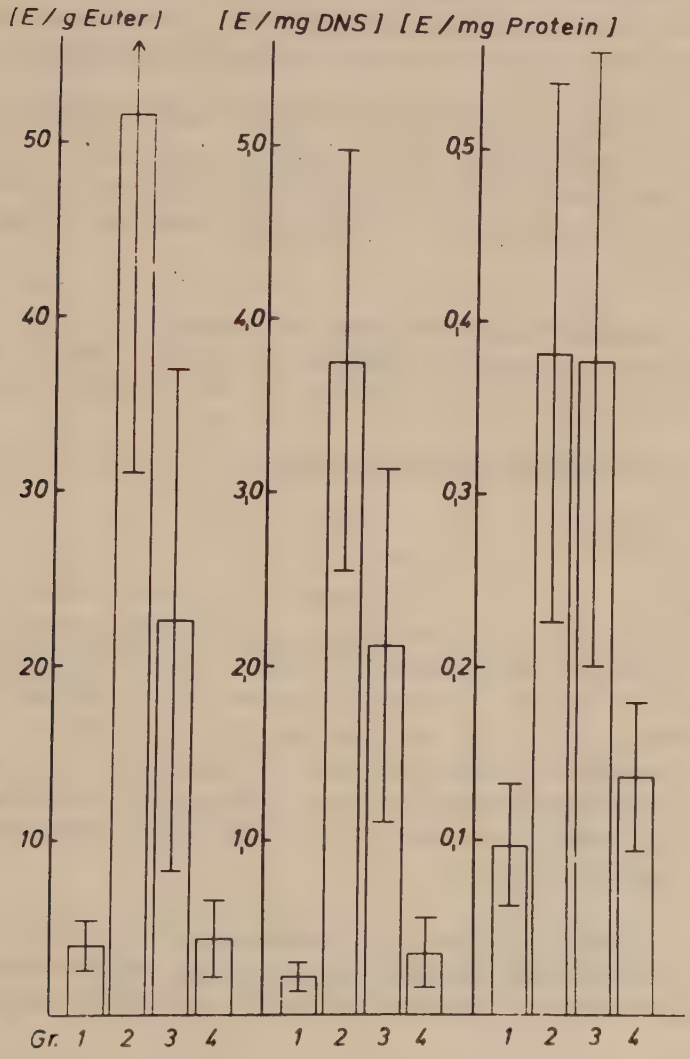
Zur Bedeutung von Gruppe 1 - 4 siehe 3.1.

	E/g Euter	E/mg DNS	E/mg Protein
Gruppe 1 (7)	3,240 ± 1,050 (4,067 ± 1,390)	0,220 ± 0,079	0,097 ± 0,035
Gruppe 2 (16)	51,794 ±20,700	3,760 ± 1,190	0,383 ± 0,156
Gruppe 3 (9)	22,674 ±14,500	2,120 ± 1,025	0,379 ± 0,178
Gruppe 4 (10)	4,530 ± 2,080	0,355 ± 0,196	0,137 ± 0,043

Tab. 5 P-Werte nach der Studentverteilung zu den Werten in Tabelle 4

	E/g Euter	E/mg DNS	E/mg Protein
Gruppe 1 - 2	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Gruppe 1 - 3	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Gruppe 1 - 4	0,7 - 0,6	0,005 - 0,001	0,1 - 0,05
Gruppe 2 - 3	0,005 - 0,001	0,005 - 0,001	0,97 - 0,95
Gruppe 2 - 4	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Gruppe 3 - 4	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Abb. 5: Aktivität der Isocitratdehydrogenase in verschiedenen Laktationsstadien. Zur Bedeutung der Gruppen 1 bis 4 siehe 3.1.



3.2.3. ATP-Citrat-Lyase

Alle in 2.1.5. beschriebenen drei Methoden wurden von uns zuerst mit Cytoplasma aus Mäuseleber auf ihre Brauchbarkeit geprüft. Wir konnten mit diesen Methoden die Aktivität der ATP-Citrat-Lyase in der Mäuseleber einwandfrei nachweisen.

Bei Versuchen mit der Mamma von laktierenden und nicht laktierenden Tieren konnten wir im Cytoplasma mit allen drei Methoden nur ganz gelegentlich eine an der Nachweisgrenze liegende Aktivität nachweisen; in den Mitochondrien wurde keine Aktivität gefunden.

Nach unseren Ergebnissen liegt die Aktivität der ATP-Citrat-Lyase im Cytoplasma des Kuheuters so niedrig, daß sie meist unter der Nachweisgrenze der von uns verwendeten Methoden liegt.

3.3. Zwischenstoffkonzentrationen

3.3.1. Citrat

Die Werte für die Konzentrationen von Citrat im Kuheuter in den einzelnen Laktationsstadien sind in Tab. 6 angegeben. Sie waren in der Mamma laktierender Kühe sehr hoch. Im Vergleich zu dem Euter von Kalbinnen war die Konzentration sowohl bei Bezug auf g Euter als auch bei Bezug auf mg DNS um den Faktor 26 höher. Von Kalbinnen zu Kühen der Gruppe 3 und 4 stieg die Konzentration ebenfalls deutlich an. Auch zwischen gut laktierenden Kühen und denen der Gruppe 3 und 4 konnten wir signifikante Unterschiede feststellen.

Wie in Tab. 7 zu sehen ist, bestand für die Citrat-Konzentration im Kuheuter zwischen sämtlichen Laktationsstadien ein hoch signifikanter Unterschied; dieser ist in Abb. 6 dargestellt.

Tab. 6 Konzentrationen von Citrat im Kuheuter in verschiedenen Laktationsstadien

In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben

Der bei Gruppe 1 in Klammern angegebene Wert wurde um den Fettgehalt des Euters korrigiert

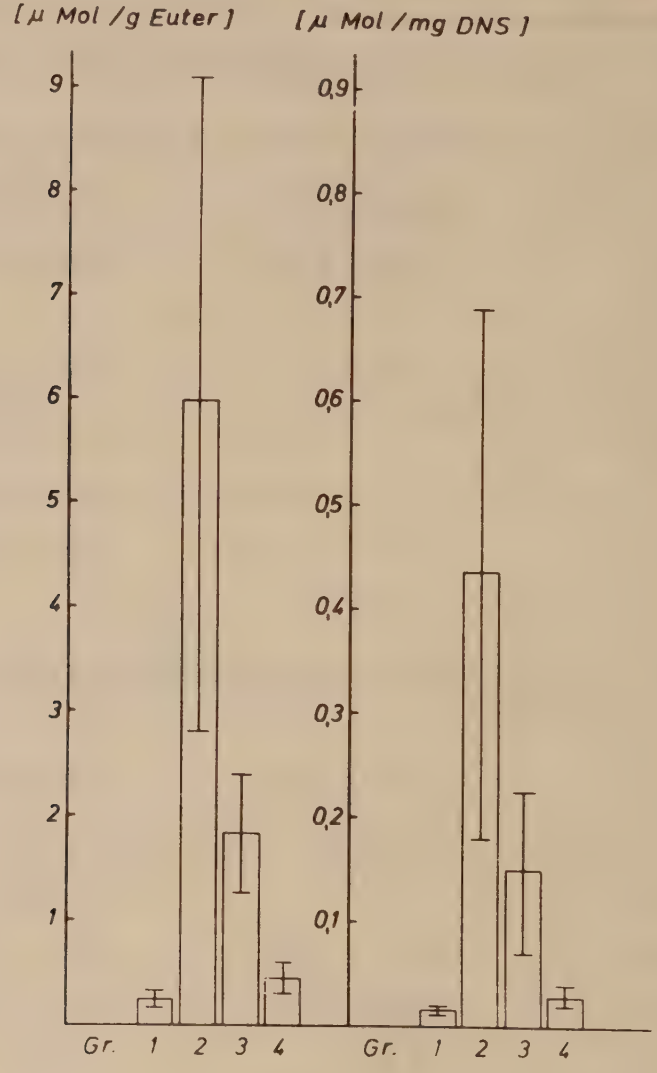
Bezüglich der Bedeutung von Gruppe 1 bis Gruppe 4 siehe 3.1.

	µ Mol/g Euter	µ Mol/mg DNS
Gruppe 1 (11)	0,228 ± 0,080 (0,312 ± 0,138)	0,0170 - 0,0026
Gruppe 2 (13)	5,970 ± 3,140	0,437 ± 0,255
Gruppe 3 (9)	1,830 ± 0,560	0,152 ± 0,073
Gruppe 4 (12)	0,445 ± 0,176	0,029 ± 0,010

Tab. 7 P-Werte nach der Student-Verteilung zu den Werten in Tabelle 6

	µ Mol/g Euter	µ Mol/mg DNS
Gruppe 1 - 2	< 0,001	< 0,001
Gruppe 1 - 3	< 0,001	< 0,001
Gruppe 1 - 4	0,001 - 0,005	0,001 - 0,005
Gruppe 2 - 3	0,001 - 0,005	0,001 - 0,005
Gruppe 2 - 4	< 0,001	< 0,001
Gruppe 3 - 4	< 0,001	< 0,001

Abb. 6: Konzentration von Citrat in verschiedenen Laktationsstadien. Zur Bedeutung der Gruppen 1 bis 4 siehe 3.1.



3.3.2. Isocitrat

Die Werte für die Konzentration von Isocitrat in den einzelnen Laktationsstadien sind in Tab. 8 zusammengestellt. Die Konzentration an Isocitrat war bei allen Gruppe sehr hoch. Die höchsten Werte fanden wir bei gut laktierenden Kühen (n Mol/g Euter), wo die Konzentration 11 mal so hoch war wie bei Kalbinnen, 7 mal so hoch wie bei trockenstehenden und 3 mal so hoch wie bei weniger gut laktierenden Kühen. Bei Bezug auf mg DNS ergaben sich ähnliche Verhältnisse. Bei trokkenstehenden Kühen konnten wir etwa doppelt so hohe Konzentrationen nachweisen wie bei Kalbinnen. Wie in der Tabelle 9 zu sehen ist, bestehen nach unseren Meßergebnissen zwischen sämtlichen Laktationsstadien signifikante Veränderungen. Eine graphische Darstellung der Verhältnisse findet sich auch in Abb. 7.

Tab. 8 Konzentrationen von Isocitrat im Kuheuter in verschiedenen Laktationsstadien

In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben

Der bei Gruppe 1 in Klammern angegebene Wert wurde um den Fettgehalt des Euters korrigiert

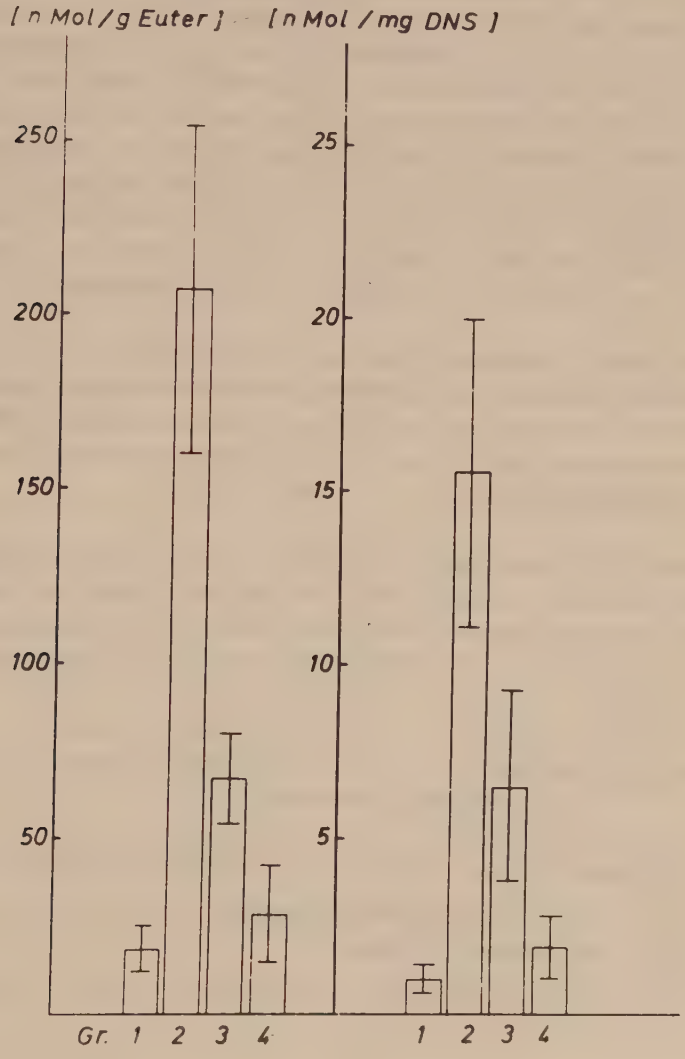
Bezüglich der Bedeutung von Gruppe 1 bis Gruppe 4 siehe 3.1.

	nMol/g Euter	nMol/mg DNS
Gruppe 1 (11)	14,2 ± 5,5 (18,7 ± 6,5)	1,02 ± 0,44
Gruppe 2 (14)	207,9 ± 47,1	15,60 ± 4,47
Gruppe 3 (9)	67,0 ± 13,2	6,56 ± 2,78
Gruppe 4 (11)	28,2 ± 13,6	1,89 ± 0,89

Tab. 9 P-Werte nach der Student-Verteilung zu den Werten in Tab. 8

	nMol/g Euter	nMol/mg DNS
Gruppe 1 - 2	$< 0{,}001$	$< 0{,}001$
Gruppe 1 - 3	$< 0{,}001$	$< 0{,}001$
Gruppe 1 - 4	0,025 - 0,05	0,005 - 0,01
Gruppe 2 - 3	$< 0{,}001$	$< 0{,}001$
Gruppe 2 - 4	$< 0{,}001$	$< 0{,}001$
Gruppe 3 - 4	$< 0{,}001$	$< 0{,}001$

Abb. 7: Konzentration von Isocitrat in verschiedenen Laktationsstadien. Zur Bedeutung der Gruppen 1 bis 4 siehe 3.1.



3.3.3. Acetyl-Coenzym A

Die Acetyl-CoA-Konzentration in der Mamma war so niedrig, daß wir nach der Zugabe von Citrat-Synthase nur eine ganz kleine Extinktionsänderung feststellen konnten, die mit dem am Spektralphotometer angeschlossenen Schreiber gerade noch ablesbar war. Die Unterschiede waren oft so gering (kleine Differenz zwischen zwei großen Zahlen), daß die dadurch hervorgerufene große Ungenauigkeit die Werte unbrauchbar machte. Zudem trat manchmal nach Zugabe des Puffers bei dem Wert mit der doppelten Menge Extrakt (siehe 2.2.3.) eine Trübung auf, und wir konnten somit keine Doppelbestimmung durchführen.

Von unseren Versuchen konnten wir nur etwa 50 % verwenden, da die Konzentration an Acetyl-CoA entweder an der Nachweisgrenze (siehe oben) lag oder ein anderer Fehler auftrat. Die brauchbaren Meßwerte für die Konzentration von Acetyl-CoA sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Sowohl bei Bezug auf g Euter als auch auf mg DNS war die Konzentration bei laktierenden Tieren etwa doppelt so hoch wie bei trockenstehenden Kühen bzw. Kalbinnen. Wie aus Tab. 11 hervorgeht, sind die Unterschiede bei beiden Bezugsgrößen signifikant.

Tab. 10 Konzentration von Acetyl-CoA im Kuheuter in verschiedenen Laktationsstadien

In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben

Der bei Gruppe 1 in Klammern angegebene Wert wurde um den Fettgehalt des Euters korrigiert

Bezüglich der Bedeutung von Gruppe 1 bis Gruppe 4 siehe 3.1.

	nMol/g Euter	nMol/mg DNS
Gruppe 1 (6)	24,4 ± 6,6 (25,9 ± 12,3)	1,51 ± 0,82
Gruppe 2 (9)	46,2 ± 18,8	3,70 ± 1,49
Gruppe 3 (7)	28,3 ± 13,9	2,37 ± 1,24
Gruppe 4 (8)	17,1 ± 5,9	1,24 ± 0,53

Tab. 11 P-Werte nach der Studentverteilung zu den Werten in Tab. 10

	nMol/g Euter	nMol/mg DNS
Gruppe 1 - 2	0,025 - 0,050	0,005 - 0,010
Gruppe 1 - 3	0,3 - 0,4	0,1 - 0,2
Gruppe 1 - 4	0,1 - 0,2	0,4 - 0,5
Gruppe 2 - 3	0,05 - 0,10	0,05 - 0,10
Gruppe 2 - 4	< 0,001	0,005 - 0,010
Gruppe 3 - 4	0,05 - 0,10	0,05 - 0,10

3.4. Prolaktin-Antiprolaktin-Tastversuche

Nach der Injektion von 15 mg Prolaktin (siehe 2.1.) fanden wir folgende Werte(1 Versuch):

1.) Enzymaktivitäten

	E/g Euter	E/mg DNS	E/mg Protein
Citrat-Synthase	10,71	0,842	0,0985
Isocitrat-dehydrogenase	25,75	2,020	0,2350

2.) Zwischenstoffkonzentrationen

	nMol/g Euter	nMol/mg DNS
Citrat	2880	226
Isocitrat	61,75	4,86

Nach der Gabe von 20 ml Antiprolaktinserum (siehe 2.1.) fanden wir folgende Werte(1 Versuch):

1.) Enzymaktivitäten

	E/g Euter	E/mg DNS	E/mg Protein
Citrat-Synthase	6,08	0,359	0,146
Isocitrat-dehydrogenase	3,17	0,187	0,076

2.) Zwischenstoffkonzentrationen

	nMol/g Euter	nMol/mg DNS
Citrat	1210,0	71,4
Isocitrat	35,8	2,12

Diese Einzelwerte liegen alle innerhalb der Spannweite der Werte der Tabellen 2 bis 9 und gestatten deshalb noch keine Aussage über die Prolaktinwirkung bzw. die Wirkung von Prolaktin-Antiserum.

4. Diskussion

4.1. Besprechung der eigenen Ergebnisse

4.1.1. Bezugsgrößen und Einteilung des Untersuchungsmaterials

Bei der Proteinbestimmung traten manchmal bei der Gruppe 2 Trübungen auf, die vermutlich von einem zu hohen Milchgehalt in der Probe kamen. Diese Trübungen ließen sich weder durch Ätherzusatz noch durch Zentrifugieren beseitigen. Wegen der damit verbundenen Erhöhung der Proteinwerte sind einige unserer Werte pro mg Protein in der Gruppe 2 etwas zu niedrig. Außerdem ließen sich Euter mit einem hohen Drüsengewebeanteil viel besser und vollständiger homogenisieren als Euter, die einen hohen Bindegewebsanteil aufwiesen. Dies führte zu einem höheren Proteinwert im Cytoplasma der Gruppe 2 gegenüber den Gruppen 3 und 4. Da Fehler im mechanischen Aufschluß beim Bezug der Enzymaktivität auf mg Protein eliminiert sind, sind diese Werte wohl am zuverlässigsten (siehe auch 1.3.1.).

Der bei Kalbinnen im Homogenat noch zusätzlich bestimmte DNS-Wert war immer höher als der DNS-Wert bei der eingefrorenen Probe. Dies liegt daran, daß beim Kleinschneiden des Euters für die Enzymbestimmung vorwiegend die Stücke mit Drüsengewebe für den Versuch verwendet wurden. Deshalb sind die Enzymwerte pro mg DNS bei Kalbinnen vergleichsweise zu niedrig. Wahrscheinlich wäre der DNS-Wert auch bei anderen Gruppen im Homogenat höher ausgefallen, da wir auch hier beim Zerkleinern des Euters etwas Fett- und Bindegewebe aussortiert haben.

Da der DNS-Gehalt pro Zelle während der Laktation nicht wesentlich zunimmt (GREENBAUM und SLATER 1957), ist er als Bezugsgröße für die Enzymaktivitäten und Zwischenstoffkonzentrationen in der Mamma sehr gut geeignet. Nach unseren Erfahrungen ist auch die Streuung der DNS-Werte innerhalb der einzelnen Gruppen

mit etwa ± 20 % niedrig genug, um sie als Bezugsgröße zu rechtfertigen. Ein nach Abzug der im Gewebe zurückgehaltenen Milch konstanter DNS-Gehalt wird auch von GREENBAUM und SLATER (1957) in der Rattenmamma während der Laktation gefunden; während in der Rattenmamma vor der Trächtigkeit und nach der Entwöhnung der Jungen der DNS-Gehalt aber wesentlich niedriger war, finden wir auch bei Kalbinnen und trockenstehenden Kühen ähnliche Werte wie in der Laktation.

Die Korrektur der Werte im Euter von Kalbinnen um den Fettgehalt liefert sicher zu hohe Werte, da Fettgewebe ebenfalls beträchtliche Mengen von Enzymen und Metaboliten enthält. Da die Fettzellen außerdem Kerne und damit DNS enthalten, erfaßt man in jedem Fall - ob man auf g Euter oder auf mg DNS bezieht - nur die Summe der Werte für Fett und Drüsengewebe. Der direkte quantitative Vergleich mit Eutern, die vorwiegend aus Drüsengewebe bestehen, hat daher nur eine begrenzte Aussagekraft.

Da das Rind eine sehr lange Laktationsperiode besitzt und in dieser Zeit auch gewisse Veränderungen in der Milchproduktion auftreten, ist es nicht möglich, an Hand von Schlachthofmaterial den genauen Laktationszeitpunkt der Tiere zu bestimmen. Außerdem hängt der Funktionszustand der Milchdrüse beim Rind sicherlich auch noch von anderen Faktoren wie z.B. Fütterung, Jahreszeiten und anderen Umwelteinflüssen ab. Diese Faktoren sind bei dem sehr heterogenen Schlachthofmaterial innerhalb der einzelnen Gruppen natürlich nicht konstant. Vor allem die Gruppeneinteilung in Gruppe 2 und 3 ist problematisch, da wir den Laktationszeitpunkt nicht genau bestimmen konnten. Daraus erkärt sich auch die relativ hohe Schwankungsbreite in diesen Gruppen.

4.1.2. Citrat-Synthase

Citrat-Synthase ist nach SRERE (1969) im Schweineherz und in der Rattenleber vor allem in den Mitochondrien lokalisiert. Im Gegensatz dazu haben wir in der Mamma der Kuh die höchste Aktivität im Cytoplasma gefunden, doch dürfte auch im Kuheuter, in dem sehr viel weniger Mitochondrien anzutreffen sind als im Herzmuskel, das Enzym in den Mitochondrien eine gewisse Aktivität besitzen.

Das pH-Optimum für die Citrat-Synthase liegt nach den Literaturangaben (SRERE 1969) in allen untersuchten Geweben zwischen 7,5 und 8,0. Der von uns für das Kuheuter gefundene Wert von pH 7,8 liegt mitten in diesem Bereich.

Die Werte in Tabelle 2 zeigen bei Bezug auf mg DNS und g Euter einen eindeutigen Abfall von laktierenden zu trockenstehenden Tieren. Dieser Abfall fehlt bei Bezug auf mg Protein. Das kommt wohl hauptsächlich daher, daß sich Euterproben mit viel Drüsengewebe leichter und vollständiger homogenisieren lassen (siehe 4.1.1.). Außerdem fiel bei der Gruppe 2 auch manchmal die Proteinbestimmung infolge von Trübungen zu hoch aus (siehe 4.1.1.); daher ist der Wert für die Gruppe 2 niedriger als der für die Gruppe 3. Die Werte in Tabelle 2 sind somit bei Bezug auf mg Protein für die Gruppen 2 bis 4 etwa gleich hoch. Der einzige zuverlässige, signifikante Unterschied in der Aktivität der Citrat-Synthase, der bei allen Bezugsgrößen auftritt, ist der zwischen Kalbinnen und Kühen.

4.1.3. Isocitratdehydrogenase

Nach WIELAND (1966) ist das Enzym in den bisher untersuchten Geweben überwiegend im Cytoplasma lokalisiert, doch finden sich kleinere Anteile der Aktivität auch in den Mitochondrien. Das Verhältnis ist dabei 9:1. Wir konnten in der Mamma der Kuh

nur im Cytoplasma eine Aktivität nachweisen, während der Anteil der Aktivität in den Mitochondrien unter der Nachweisgrenze lag. Im Herzmuskel, in dem der Enzymgehalt am höchsten ist, liegt das pH-Optimum bei 7,7; genau dasselbe pH-Optimum fanden wir in der Mamma der Kuh. Beim Zusatz von Mn^{++} zur Reaktionslösung wurde bisher in allen untersuchten Geweben (WIELAND 1966) eine höhere Aktivität als beim Zusatz von Mg^{++} gefunden. Die Substratsättigung mit Isocitrat liegt bei allen Geweben (ebenso auch im Kuheuter) zwischen 300 und 400 µMol Isocitrat/ml Lösung.

Die sehr große Streubreite der Aktivität der Isocitratdehydrogenase, wie sie in der Tabelle 4 angegeben wurde, hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß das Enzym besonders stark von Parametern abhängt, die wir bei dem heterogenen Schlachthofmaterial nicht konstant halten konnten. BALDWIN et al. (1969) fanden z.B., daß im Fettgewebe der Kuh die Aktivität der Isocitratdehydrogenase bei der Fütterung mit Kraftfutter 200mal höher war als bei der Fütterung mit Heu. Neben anderen Faktoren dürfte hier vor allem auch der Laktationszeitpunkt, der bei unseren Tieren doch recht unterschiedlich war, eine große Rolle spielen.

Die Aktivität der Isocitratdehydrogenase scheint nämlich besonders stark vom Laktationsstadium abhängig zu sein. Dies zeigt sich in dem Abfall der Aktivität von gut laktierenden zu trockenstehenden Kühen um den Faktor 10, wenn man die Aktivität auf mg DNS und g Euter bezieht. Beim Bezug auf mg Protein ist der Abfall nicht so gravierend, doch ist er auch hier hoch signifikant. Zwischen der Gruppe 2 und 3 besteht beim Bezug auf mg Protein kein Unterschied; wahrscheinlich weil auch hier die Proteinwerte der Gruppe 2 etwas zu hoch ausfielen. Außerdem kann wohl auch eine gewisse Willkür in der Einteilung dieser beiden Gruppen (siehe 4.1.1.) hier eine Rolle spielen.

Zwischen trockenstehenden Kühen und Kalbinnen fanden wir bei Bezug auf g Euter und mg Protein keinen Unterschied in den Werten. Der Unterschied bei Bezug auf mg DNS ist auf den höheren Wert von DNS im Homogenat von Kalbinnen zurückzuführen (siehe 4.1.1.) und das hat daher nichts mit einer Veränderung der Aktivität der Isocitratdehydrogenase zu tun.

4.1.4. ATP-Citrat-Lyase

Die Aktivität der ATP-Citrat-Lyase lag an der Nachweisgrenze der von uns verwendeten Bestimmungsmethoden. Deshalb waren die Werte von unseren Proben fast immer nicht auswertbar. Die Nachweisgrenze für die spektralphotometrische Methode liegt bei ca. 2,5 nMol/g Euter bzw. 0,08 nMol/mg Protein bzw. 0,4 nMol/mg DNS, während sie für die Isotopenmethode bei 0,08 nMol/g Euter bzw. 0,002 nMol/mg Protein bzw. 0,01 nMol/mg DNS liegt.

4.1.5. Citrat

Die Konzentration an Citrat zeigte sowohl bei Bezug auf g Euter als auch auf mg DNS etwa gleich große und sehr erhebliche Schwankungen. Die DNS-Bestimmung verursachte mithin keine zusätzlichen Fehler. Durch die Umrechnung auf mg DNS wurden aber auch keine günstigeren Ergebnisse erzielt. Schwankungen in der Zellzahl scheinen also bei den von uns untersuchten Laktationsstadien keine große Rolle zu spielen (siehe auch 4.1.1.). Trotz der großen Schwankungsbreite der einzelnen Werte in Tabelle 6 konnten wir eine einwandfreie Abhängigkeit des Citratgehaltes von der Laktation feststellen. Gerade auf dem Höhepunkt der Laktation scheint die Citratkonzentration vom Laktationszeitpunkt sehr stark abhängig zu sein; daher auch die besonders großen Schwankungen in der Gruppe 2. Dies zeigt sich auch in einem enormen Abfall der Werte von Gruppe 2 zu Gruppe 3. Auch zwischen der Gruppe 4 und der Gruppe 1 besteht noch ein deut-

licher Unterschied, der darauf hinweist, daß der ursprüngliche niedrige Citratspiegel von Kalbinnen nach Beendigung der Laktation nicht wieder erreicht wird.

4.1.6. Isocitrat

Der Abfall der Isocitratkonzentration von Gruppe zu Gruppe ist nicht ganz so hoch wie der entsprechende Abfall der Citratkonzentration, doch besteht auch hier zwischen sämtlichen Laktationsstadien ein signifikanter Unterschied. Vergleichsweise beträgt der Gehalt von Isocitrat (Citrat) bei Gruppe 1 9% (3,8 %), bei Gruppe 3 32,2 % (30,6 %) und bei Gruppe 4 13,5 % (7,5 %) des Wertes von Gruppe 2.

Auch bei der Isocitratkonzentration im Euter von trockenstehenden Kühen wird der Ausgangswert von Kalbinnen nicht mehr erreicht. Außerdem konnten wir bei den Isocitratwerten keine so großen Streubreiten wie bei den Citratwerten feststellen. Dies alles deutet darauf hin, daß der Isocitratgehalt nicht so sehr vom Laktationszeitpunkt abhängt wie der Citratspiegel.

4.1.7. Acetyl-CoA

Die von uns bestimmten Acetyl-CoA-Konzentrationen sind, da wir nur eine kleine Zunahme einer ziemlich hohen Extinktion messen konnten, naturgemäß relativ ungenau. Trotzdem sind die Werte im Euter von laktierenden Kühen deutlich höher als in dem von trockenstehenden Kühen oder von Kalbinnen. Der Wert im Euter von Kühen gegen Ende der Laktation (Gruppe 3) liegt zwischen dem von Gruppe 2 und 4, zeigt jedoch wegen der großen Schwankungsbreite der Werte gegenüber diesen keine signifikanten Unterschiede.

Da wir bei den niedrigen Konzentrationen von Acetyl-CoA im Euter an der Grenze der optischen Bestimmungsmethode liegen, wäre eine Überprüfung der Werte mit einer empfindlicheren fluorimetrischen Methode wünschenswert, für die aber am hiesigen Institut bisher kein geeignetes Fluorimeter zur Verfügung stand.

4.2. Vergleich unserer Ergebnisse mit bereits aus der Literatur bekannten Werten

4.2.1. RNS-Gehalt und RNS/DNS-Quotient

Der Gehalt an RNS nimmt bei Labortieren von der frühen Trächtigkeit bis zur späten Laktation laufend zu und während der Involution wieder ab (GREENBAUM und SLATER 1957). Analog dazu ist auch der RNS-Gehalt im Kuheuter bei laktierenden Tieren sehr viel höher als bei trockenstehenden Kühen oder Kalbinnen, wenn man ihn um den Milchgehalt des Euters korrigiert oder auf mg DNS bezieht (siehe Tabelle 1). Da in unseren Versuchen der DNS-Gehalt, der um den Milchgehalt des Euters korigiert wurde, im Mittel von Gruppe zu Gruppe relativ konstant ist, laufen der Gehalt an RNS und RNS/DNS weitgehend parallel. Da der Quotient RNS/DNS ein Maß für die mitotische Aktivität der Zelle ist, war zu erwarten, daß er auch bei Kühen sehr stark vom Funktionszustand des Euters abhängt und zu Zeiten hoher Proteinsynthese hoch ist. Für den Quotienten RNS/DNS wurde in früheren Arbeiten in der Ratten- und Mäusemamma ein starker Anstieg nach der Geburt (BALDWIN und MILLIGAN 1966; MUNFORD 1964; KUHN und LOWENSTEIN 1969) und ein Abfall nach dem Absetzen der Jungen (GREENBAUM und SLATER 1957; SIMPSON und SCHMIDT 1969) festgestellt. Der Abfall des RNS und des Quotienten RNS/DNS während der Involution der Mamma ist wahrscheinlich mit dem gleichzeitigen Rückgang der Proteinsynthese verbunden (siehe auch GREENBAUM und SLATER).

4.2.2. Citrat-Synthase

Die von uns gemessenen Werte für die Aktivität der Citrat-Synthase im Kuheuter stimmen größenmäßig sehr gut mit denen von GREENBAUM et al. (1971) überein, die die Aktivität in der Mamma der Ratte aus den beteiligten Zwischenstoffkonzentrationen berechneten. Diese Autoren fanden bei trächtigen Ratten 0,46 µMol/g Gewebe/min., was unserem Wert für Kalbinnen (siehe Tabelle 7) sehr nahe kommt. Am 1. und 14. Tag der Laktation sind die Werte 1,39 bzw. 2,92 µMol/g Gewebe/min.; unsere Werte bei Kühen auf dem Höhepunkt und gegen Ende der Laktation lagen in dem gleichen Bereich. Auch die Veränderungen der Aktivität pro g Euter sind ähnlich wie bei Labortieren (GREENBAUM 1971); eine ausgeprägte Erhöhung während der Laktation und ein Abfall nach deren Beendigung. Allerdings konnten wir bei Bezug auf mg Protein keine deutlichen Veränderungen der Aktivität der Citrat-Synthase beobachten, so daß wir nicht sicher sind, ob sich tatsächlich die Enzymaktivität pro g Euter ändert und nicht nur die Menge der aufgeschlossenen Zellen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Feststellung von GREENBAUM et al. (1971) an der Ratte, daß die Aktivität der Citrat-Synthase stets höher war, als die der Phosphofruktokinase. Entsprechende Werte am Kuheuter liegen noch nicht vor, werden aber zur Zeit am hiesigen Institut (WALDSCHMIDT) bestimmt.

4.2.3. Isocitratdehydrogenase

Da, wie schon BAUMAN et al. (1970) feststellten, die Aktivität der Isocitratdehydrogenase sehr stark von Spezies zu Spezies schwankt, ist es nicht sinnvoll, unsere Werte mit denen von Labortieren zu vergleichen. Die Aktivität, die von BAUMAN (1970) im Kuheuter ohne Angabe des Laktationszeitpunktes angegeben wird, ist mit 989 µMol/min./mg Protein zwei bis dreimal so hoch wie unser Wert an hochlaktierenden Kühen; dieser Wert kann aber nicht direkt verglichen werden, da BAUMAN die

Aktivität bei 37°C gemessen hat, wir dagegen die Bestimmung bei 25°C durchgeführt haben, und die Aktivität naturgemäß bei höheren Temperaturen höher ist. Eine genaue Übereinstimmung mit Literaturwerten ist wegen der Fütterungsabhängigkeit dieses Enzyms (BALDWIN 1969) ohnehin nicht zu erwarten. Insgesamt bestätigen unsere Untersuchungen die relativ hohe Isocitratdehydrogenaseaktivität im Kuheuter. Ob diese aber als NADPH-Quelle in größerem Umfang in Frage kommt, hängt nicht nur von der potentiellen Aktivität, sondern vor allem vom Umsatz ab (siehe dazu auch 4.3.3.).

Die Aktivität der Isocitratdehydrogenase hängt nach unseren Befunden sehr stark von der Laktation ab. Ähnlich wie bei Labortieren (siehe 1.3.3.2.) werden im Kuheuter während der Laktation viel höhere Werte gefunden als bei Kalbinnen und trokkenstehenden Kühen. Dies steht nicht unbedingt im Widerspruch zu den Befunden von BALDWIN (1966); dieser stellte fest, daß sich zum Zeitpunkt der Geburt im Kuheuter im Gegensatz zur Mamma von Labortieren keine so dramatischen enzymatischen Veränderungen abspielen. Da BALDWIN nur Messungen kurz vor und nach der Geburt durchgeführt hat, gestatten seine Werte keine Aussage darüber, welche Veränderungen schon vor oder während der Trächtigkeit (was unserem Vergleich zwischen Kalbinnen und Kühen entspricht) oder nach der Involution (was unserem Vergleich zwischen laktierenden und trockenstehenden Kühen entspricht) auftreten.

4.2.4. ATP-Citrat-Lyase

Die Aktivität der ATP-Citrat-Lyase ist zwar nach BAUMAN et al. (1970) im Kuheuter sehr niedrig, müßte aber mit 2 nMol/mg Protein/min. noch immer innerhalb der Nachweisgrenze zumindest der Isotopenmethode liegen. Einen Vergleich mit anderen Tierarten durchzuführen hat auch bei diesem Enzym keinen Sinn, weil seine Aktivität in deren Mamma wesentlich höher liegt.

Nur bei der Ziege (HARDWICK 1966) scheint noch eine ähnlich niedrige Aktivität des Enzyms im Euter vorzuliegen wie bei der Kuh (0,5 - 2,5 nMol/min./mg Protein). Versuche über den Einbau von ^{14}C-Citrat in Fettsäuren zufolge darf in verschiedenen Geweben von Wiederkäuern praktisch keine oder nur eine sehr niedrige Aktivität der ATP-Citrat-Lyase vorliegen (HARDWICK 1966; LINZELL und MEPHAM 1963). Da sich das Enzym in unseren Versuchen mit der Isotopenmethode nicht im Eutercytoplasma nachweisen ließ, während wir mit der spektralphotometrischen Methode auch schon manchmal knapp über der Nachweisgrenze liegende Werte erhielten, ergibt sich eine gewisse Parallele zu diesen Literaturbefunden.

4.2.5. Citrat

Bisher liegen keine Untersuchungen über den Citratgehalt im Kuheuter vor. Der hohe Citratgehalt bei laktierenden Kühen rührt zu einem großen Teil von dem Citratgehalt der Kuhmilch her (in der Milch beträgt der Citratgehalt ca. 2 g/l oder 10 µMol/ml). So beträgt z.B. bei der Gruppe 2 der mittlere Citratgehalt pro g Euter nach Abzug des mittleren Citratgehalts der Milch nur noch etwa 0,740 µMol/g Euter.

Die Werte von GREENBAUM et al. (1971) für die Citratkonzentration in der Mamma der Ratte liegen mit 380 bis 780 nMol/ml niedriger als unsere Werte im Kuheuter. Dies erklärt sich aus dem niedrigeren Citratgehalt der Rattenmilch. In der Mamma der Ratte wurden vor der ersten Trächtigkeit keine Untersuchungen gemacht. Es können also keine Parallelen zu unseren Werten an Kalbinnen gezogen werden. Es fällt auf, daß in der Rattenmamma die Citratkonzentration nur in den Mitochondrien am Ende der Laktation steil abfiel, während sie im Cytoplasma sogar zunahm; die Gesamtkonzentration nahm jedoch in der Mamma nach Entwöhnung der Jungen um 30 % ab. Daß nach unseren Befunden der Citratgehalt bei trockenstehenden Kühen wesentlich geringer

ist als bei laktierenden Kühen, liegt an dem höheren Citratgehalt der Kuhmilch.

4.2.6. Isocitrat

Auch die Isocitratkonzentration im Kuheuter wurde bisher noch nicht gemessen. Die Werte in der Rattenmamma (GREENBAUM et al. 1971) liegen mit ca. 25 nMol/ml wesentlich unter unseren Werten im Kuheuter. In der Mamma der Ratte wurden in verschiedenen physiologischen Zuständen keine ausgeprägten Veränderungen der Isocitratkonzentration beobachtet. So fiel diese nach Entwöhnung der Jungen nur um etwa 15 % ab. Dem gegenüber steht die von uns beobachtete Abnahme um 87 % im Euter trockenstehender Kühe. Außerdem war die Konzentration von Malat im Euter laktierender Kühe nur um 3,3 mal, die Konzentration von α-Ketoglutarat 5,8 mal so hoch wie bei trockenstehenden Kühen. Die Anhäufung eines Metaboliten im Euter laktierender Kühe ist also um so geringer, je weiter dieser am Ende des Citratzyklus steht. Auch beim Isocitrat sind die Unterschiede zwischen laktierenden und trockenstehenden Kühen ja schon geringer als beim Citrat (siehe 4.1.6.).

4.2.7. Acetyl-CoA

Für die Acetyl-CoA-Konzentration im Kuheuter liegen bisher in der Literatur keine Angaben vor. In der Rattenmamma liegen die Acetyl-CoA-Konzentrationen bei 20 bis 40 nMol/ml intrazellulärèn Wassers; unsere Werte im Kuheuter liegen mit 17 bis 46 nMol/g Euter in dem gleichen Bereich.

Nach GREENBAUM et al. (1971) war die Acetyl-CoA-Konzentration in der Mamma laktierender Ratten etwa doppelt so hoch als in der trächtiger Ratten oder nach Entwöhnung der Jungen. In den Versuchen dieser Autoren zeigte sich also auch quantitativ eine ähnliche Veränderung des Acetyl-CoA-Gehalts wie bei un-

seren Messungen an Kalbinnen, laktierenden und trockenstehenden Kühen (siehe 4.1.7.).

4.3. Allgemeine Diskussion der biochemischen und physiologischen Zusammenhänge

Die von uns beobachtete Anhäufung von Zwischenstoffen des Citronensäurezyklus im laktierenden Kuheuter zeigt an, daß der Durchfluß durch diesen Zyklus verhältnismäßig gering ist. Die Anhäufung des Citrats ist offenbar so stark, daß dieses sogar in die Milch abgegeben wird. Unsere Werte stellen eine Summe der Substratkonzentrationen in allen intrazellulären Räumen dar, doch dürften sie hauptsächlich die Verhältnisse im Cytoplasma wiederspiegeln, da hier die Konzentration am höchsten ist. Die Stauung könnte auf einer Hemmung der Bernsteinsäure-Dehydrogenase beruhen, die in Lebermitochondrien das Schrittmacherenzym des Citronensäurezyklus ist. HARDWICK (1966) fand jedoch am durchströmten Ziegeneuter, daß der radioaktive Kohlenstoff aus $NaH^{14}CO_3$ überwiegend in das C-Atom 6 des Citrats eingebaut wird. Er schließt daraus, daß die reversiblen Reaktionen des Citronensäurezyklus in der Mamma von Wiederkäuern umgekehrt verlaufen, daß also eine Carboxylierung von α-Ketoglutarat zu Citrat stattfindet. Überträgt man diese Vorstellung auf unsere Befunde, so könnte auch eine Hemmung der ATP-Citrat-Lyase, die Citrat zu Oxalacetat und Acetyl-CoA abbaut, den Anstau der Zwischenstoffe bewirken. In Übereinstimmung damit steht die extrem niedrige Aktivität der ATP-Citrat-Lyase in der Mamma von Wiederkäuern (BAUMAN et al. 1970; HARDWICK 1966), die in unseren Versuchen am Kuheuter unter der Nachweisgrenze lag. Auf eine äußerst niedrige Aktivität dieses Enzyms im Wiederkäuer in vivo weist auch der Befund hin, daß hier der ^{14}C sowohl aus Glukose als auch aus Acetat im Citrat eingebaut wird, während man in den Fettsäuren - die aus Acetyl-CoA entstehen - nur den ^{14}C aus Acetat findet; Citrat kann hier also offenbar nicht zu Acetyl-CoA abgebaut werden (HARDWICK

1966). Die Vorstellung einer Umkehr der Reaktionsfolge im Citronensäurezyklus würde auch leichter erklären, warum in unseren Versuchen die Anhäufung der Zwischenstoffe im laktierenden Kuheuter in der Reihe α-Ketoglutarat - Isocitrat - Citrat zunimmt. Der Stau pflegt ja kurz vor dem Engpaß am größten zu sein. Auf die Besonderheiten der Wiederkäuermamma in diesem Bereich des intermediären Stoffwechsels sind vor allem HARDWICK (1966) und BAUMAN (1970) näher eingegangen. Da die Verhältnisse bei der Ratte ganz anders liegen, ist auch verständlich, daß GREENBAUM et al. (1971) keine starken Veränderungen der Konzentration von Citrat und Isocitrat in der Rattenmamma in verschiedenen physiologischen Zuständen fanden.

Die Konzentrationen von Acetyl-CoA sind trotz des Mangels an ATP-Citrat-Lyase im Kuheuter nach unseren Befunden etwa genauso groß wie in der Mamma der Ratte und steigen während der Laktation bei beiden Tierarten sogar auf das doppelte an. Das Acetyl-CoA entsteht allerdings in der Kuh nicht durch Abbau von Glukose, sondern durch direkte Acetylierung von Acetat (HARDWICK 1966; JONES 1969). Der mangelnden Bildung von Acetyl-CoA aus Citrat durch ATP-Citrat-Lyase steht bei der Kuh ein Verbrauch des Acetyl-CoA zur Citratbildung mittels Citrat-Synthase gegenüber. Letztere könnte zwar auf Grund der hohen in vitro-Aktivität der Citrat-Synthase begünstigt sein, spielt aber wohl in vivo infolge des starken Anstaus von Citrat (feedback-Hemmung) auch keine große Rolle. In beiden Tierarten wird bei der laktierenden, d.h. Fettsäuren synthetisierenden Mamma die Gleichgewichtskonzentration von Acetyl-CoA wohl hauptsächlich durch den Verbrauch bei der Fettsäurensynthese und durch die Bildung aus Glukose bzw. Acetat eingestellt. Daß gegenüber nicht-laktierenden Tieren in der Mamma ein Überangebot an Acetyl-CoA vorliegt, wirkt dabei sicher begünstigend auf die Fettsäurensynthese.

Neben der äußerst niedrigen Aktivität der ATP-Citrat-Lyase gehört auch die besonders hohe Aktivität der NADP-Isocitrat-Dehydrogenase im Cytoplasma zu den Besonderheiten des intermediären Stoffwechsels in der Mamma von Wiederkäuern. BAUMAN (1970) nimmt an, daß das Enzym hier eine der Hauptquellen der NADPH für die Fettsäurensynthese ist. In Übereinstimmung damit steht unser Befund, daß die Aktivität des Enzyms sehr stark von der Milchbildung abhängt und bei laktierenden Kühen wesentlich höher ist als bei trockenstehenden Kühen. Auch wurde in parallelen Versuchen am gleichen Tiermaterial von WALDSCHMIDT gefunden, daß das Fließgleichgewicht NADP/NADPH während der Laktation mehr auf Seiten der reduzierten Verbindung liegt. Da im laktierenden Kuheuter das Verhältnis von Isocitrat zu α -Ketoglutarat (siehe 4.2.6.) etwas höher ist als im Euter von trockenstehenden Kühen, sieht es aber nicht so aus, als ob der Umsatz der Isocitratdehydrogenase in vivo hier sehr groß wäre; möglicherweise bleibt daher die hohe Aktivität des Enzyms in vivo ungenützt.

Unsere Messungen liefern keine Aussage über die Verhältnisse in den Mitochondrien. Die Aktivität der Isocitratdehydrogenase scheint hier im Kuheuter sehr niedrig zu sein. Nachdem die Konzentrationen von Citrat und Malat sich bei der Mamma der Ratte in den Mitochondrien gegenläufig zum Cytoplasma verhalten, könnten auch bei der Kuh entscheidende Unterschiede in den in vivo Aktivitäten der Enzyme in den Mitochondrien vorliegen.

Die hier beschriebenen Veränderungen des intermediären Stoffwechsels werden sicher durch die mammogenen Hormone beeinflußt. Der Angriffspunkt der einzelnen Hormone im intermediären Stoffwechsel ist aber noch völlig unbekannt. Direkte Messungen nach Gabe von Prolaktin und Anti-Prolaktin am Schlachthof wurden in jeweils einem Tastversuch an einem Tier erprobt. Wenige Stichprobenwerte lagen dabei innerhalb der Schwankungsbreite für laktierende Kühe. Eine Deutung des Ergebnisses ist

schwierig, weil man den Ausgangswert der behandelten Kuh nicht kennt und die Schwankungsbreiten innerhalb der einzelnen Gruppen relativ groß sind. Eine Untersuchung von Biopsieproben am gleichen Tier zu verschiedenen Zeitpunkten würde hier vielleicht weiterführen, jedoch fehlen derzeit dafür die nötigen technischen Voraussetzungen.

5. Zusammenfassung

In mittels der Frierstoppmethode entnommenen Euterproben von Kühen (Schlachthofmaterial) wurden einige Zwischenstoffkonzentrationen des Citratzyklus mit enzymatisch-optischen Tests bestimmt. Außerdem wurde die Aktivität einiger Enzyme des Citratzyklus in frischen Euterproben gemessen. Die Meßwerte wurden auf g Euter, mg DNS und mg Protein (letzteres nur bei Enzymaktivitäten) bezogen. Dabei wurden die Tiere nach dem Funktionszustand und dem Milchgehalt des Euters in vier Gruppen eingeteilt: Kalbinnen, Kühe auf dem Höhepunkt der Laktation, Kühe gegen Ende der Laktation und trockenstehende Kühe.

1. Die Aktivität der Citrat-Synthase war im Eutercytoplasma bei allen Bezugsgrößen bei Kühen signifikant höher als bei Kalbinnen. Bei Bezug der Aktivität auf g Euter und mg DNS war auch ein signifikanter Abfall der Aktivität von laktierenden zu trockenstehenden Kühen nachzuweisen.

2. Die Aktivität der Isocitratdehydrogenase war stärker vom Laktationsstadium abhängig als die Aktivität der Citrat-Synthase. Dabei konnten zwischen sämtlichen Gruppen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die höchste Aktivität fanden wir bei Tieren, die auf dem Höhepunkt der Laktation standen und die niedrigste Aktivität bei Kalbinnen.

3. Eine Aktivität der ATP-Citrat-Lyase konnte im Euter der Kuh nicht nachgewiesen werden.

4. Die Konzentration an Citrat war in den untersuchten Euterproben sehr vom Milchgehalt des Euters abhängig. Bei Kühen mit sehr viel Milch im Euter war die Citratkonzentration signifikant höher als bei Kalbinnen und trockenstehenden Kühen.

5. Die Konzentration an Isocitrat war nicht ganz so stark vom Laktationsstadium abhängig wie die Konzentration von Citrat, zeigte aber dennoch signifikante Unterschiede zwischen allen Gruppen. Die Isocitratkonzentration war bei laktierenden Kühen deutlich höher als bei trockenstehenden Kühen oder Kalbinnen.

6. Die Konzentration an Acetyl-CoA war im laktierenden Kuheuter etwa doppelt so hoch wie im Euter von Kalbinnen oder trockenstehenden Kühen.

7. In je einem Tastversuch konnte ein Einfluß von Prolaktin bzw. Antiprolaktin-Serum auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzymaktivitäten und Zwischenstoffkonzentrationen nicht nachgewiesen werden.

Summary

Some metabolite levels of the citric acid cycle were determined with enzymic optical tests in udder samples from cows (slaughterhouse material) obtained by freeze clamping technique. Besides some enzyme activities of the citric acid cycle were measured in fresh udder samples. The measured values were calculated per g udder, per mg DNA and per mg protein (the latter only for enzyme activities). The animals were subdivided into four groups according to the functional state and the milk content of the udder: heifers, cows at the climax of lactation, cows towards the end of lactation and dry cows.

1. The activities of citrate synthase in udder cytosol were significantly higher in cows than in heifers with all criterions of calculation. A significant decrease in the activity between lactating and dry cows could be only found when calculating the values per g udder and per mg DNA.

2. The activities of isocitrate dehydrogenase varied to a greater

extent between different stages of lactation than the activities of citrate synthase. Significant differences could be observed between all groups. We found the highest activities in animals at the climax of lactation and the lowest activities in heifers.

3. An ATP citrate lyase activity could not be detected in cow udder.

4. Citrate concentrations in the udder samples were highly dependent on the milk content of the gland. In cow udders with high milk content the citrate concentrations were significantly higher than in the udders of heifers or dry cows.

5. Mammary isocitrate concentrations were not quite as highly dependent on the lactation stage as citrate concentrations, but also showed significant differences between all groups of cattle. Mammary isocitrate concentrations were destinetly higher in lactating cows than in heifers or dry cows.

6. Mammary acetyl-CoA concentrations were nearly twice as high in lactating cows as in heifers or dry cows.

7. In one preliminary experiment an influence of prolactin on the enzyme activities and metabolite levels examined in the present paper could not be established.

6. Literaturverzeichnis

ABRAHAM S., CHAIKOFF I. L.
Glycolytic pathways and lipogenesis in mammary glands of lactating and nonlactating normal rats
J. Biol. Chem. 234, 2246 (1959)

BALDWIN R.L.
Development of Milk Synthesis
J. Dairy Sci. 52, 729 - 736 (1969)

BALDWIN R.L.
Enzymatic activities in mammary gland of several species
J. Dairy Sci. 49, 1533 (1966)

BALDWIN R.L., LIN H.J., CHENG W., CABRERA R., RONNING M.
Enzyme and metabolite levels in mammary and abdominal adipose tissue of lactating dairy cows
J. Dairy Sci. 52, No. 2, 183 - 187 (1969)

BALDWIN R.L., CHENG W.
Metabolite changes associated with the initiation and maintenance of lactation in rats and cows
J. Dairy Sci. 52, 523 (1969)

BALDWIN R.L., MARTIN R.J.
Effects of hypophysectomy and several hormone replacement therapies upon patterns of nucleic acid and protein synthesis and enzyme levels in lactating rat mammary glands
J. Dairy Sci. 51, 748 (1968)

BALDWIN R.L., MARTIN R.J.
Protein and nucleic acid synthesis in rat mammary glands during early lactation
J. Endocrinol. 82, 1209 (1968)

BALDWIN R.L., MILLIGAN L.P.
Enzymatic changes associated with the initiation and maintenance of lactation in rat
J. Biol. Chem. 241, 2058 (1966)

BAIRD G.D., HIBBIT K.G.
Enzymes involved in acetoacetate formation in various bovine tissues
Biochem. J. 117, 703 (1970)

BAIRD G.D., HEITZMANN R.J.
Gluconeogenesis in the cow
Biochem. J. 116, 865 (1970)

BAUMAN D.E., BROWN R.E., DAVIS C.L.
Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow and cow
Archiv of Biochem. and Biophys. Vol. 140, Nr. 1, 237 - 244 (1970)

BERGMEYER H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim (1970)

BREW K., CAMPBELL P.N.
Studies on the biosynthesis of protein by lactating guinea-pig mammary glands
Biochem. J. 102, 265 (1967)

BREW K., VANAMAN T.C., HILL R.L.
The role of α -lactalbumin and the A-protein in lactose synthase: A unique mechanism for the control of a biological reaction
Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 491 (1968)

BUCKEL W., EGGERER H.
Zur optischen Bestimmung von Citrat-Synthase und Acetyl-CoA
Biochem. Zeitschr. 343, 29 - 43 (1965)

BURTON K.
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA
Biochem. J. 62, 315 (1965)

CAVALLI-SFORZA L.
Grundbegriffe der Biometrie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1964)

CERIOTTI G.
Determination of nucleic acids in animal tissues
J. Biol. Chem. 214, 59 (1955)

CLELAND W.W., THOMPSON V.W., BARDEN R.E.
Isocitrat-Dehydrogenase
In "Methods in Enzymology", Volume XIII, ed. by Lowenstein J.M., Academic Press: New York and London (1969)

COWIE A.T.
Influence of hormones on mammary growth and milk sekretion
In "Lactation", ed. by Ian R. Falconer, Butterworths: London (1971)

FOLLEY S.J.
Recent advances in the physiology and biochemistry of lactation
Dairy Sci. Abstr. 23, 511 (1961)

GREENBAUM A.L., Mc LEAN P., GUMAA K.A.
The control of pathways of carbohydrate metabolism in mammary gland
In "Lactation", ed by Ian R. Falconer, Butterworths: London (1971)

GREENBAUM A.L., SLATER T.F.
Studies on the particulate components of the rat mammary gland. 2. Changes in the levels of nucleic acids of the mammary glands of rats during pregnancy, lactation and mammary involution
Biochem. J. 66, 155 (1957)

GUL B., DILS R.
Enzymatic changes in rabbit and rat mammary gland during the lactation cycle
Biochem. J. 112, 293 (1969)

GUL B., DILS R.
Pyruvate carboxylase in lactating rat and rabbit mammary gland
Biochem. J. 111, 263 (1969)

HARDWICK D.C.
The fate of acetyl groups derived from glucose in the isolated perfused goat udder
Biochem. J. 99, 228 (1966)

HARDWICK D.C., LINZELL J.L., MEPHAM T.B.
The metabolism of acetate and glucose by the isolated perfused udder
Biochem. J. 88, 213 (1963)

HESS B., BRAND K.
In "Control of Energy Metabolism", ed. by Chance B., Estabrook R.W. and Williamson J.R., Academic Press, New York and London p. 111 (1965)

HOWANITZ P.J., LEVY H.R.
Acetyl-CoA-Carboxylase and citric cleavage enzyme in rat mammary gland
Biochem. biophys. Acta 106, 430 (1965)

JONES E.A.
Reviews of the progress of dairy science
J. Dairy Res. 36, 145 (1969)

KARG H.
Neurohormonale Steuerung der Euterentwicklung und -funktion
Der Tierzüchter, Heft Nr. 13 (1971)

KARG H.
Hormonale Regulation der Milchdrüsenentwicklung und der Milchbildung
In "Handbuch für Tierernährung", Band II, herausgegeben von Lenkeit W., Breirem K. und Crasemann E., Verlag Paul Parey (1972)

KATZ J., ROGNSTADT R.
The metabolism of tritiated glucose by rat adipose tissue
J. biol. Chem. 241, 3600 (1966)

KON S.K., COWIE A.T.
Milk: the mammary gland and its secretion
Academic Press, New York (1961)

KUHN N.J.
Control of lactogenesis and lactose biosynthesis
In "Lactation", ed. by Ian R. Falconer, Butterworths: London (1971)

KUHN N.J.
Metabolism of uridine diphosphate galactose by mammary gland
Biochem. J. 106, 743 (1968)

KUHN N.J., LOWENSTEIN J.M.
Lactogenesis in the rat. Changes in metabolic parameters at parturition
Biochem. J. 105, 995 (1967)

LACHANCE J.P., MORAIS R.
Pathways of fatty acid biosynthesis in the rabbit mammary gland
Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 269 (1965)

Mc LEAN P.
Carbohydrate metabolism of mammary tissue
Biochem. et Biophys. Acta 30, 303 (1958)

LEVY R.H.
The effects of weaning and milk on mammary fatty acid synthesis
Biochem. et Biophys. Acta 84, 229 (1964)

LINZELL J.L.
Techniques for measuring nutrient uptake by the mammary glands
In "Lactation", ed. by Ian R. Falconer, Butterworths: London (1971)

LOWENSTEIN J.M.
In "Metabolic roles of citrate", ed. by Goodwin T.W., biochemical society Symposia 27, p. 61, Academic Press, New York (1968)

LOWRY O.H., PASSONNEAU J.V.
The relationships between substrates and enzymes of glycolysis in brain
J. biol. Chem. 239, 31 (1964)

MARIER J.R., BOULET M.
Direct analysis of lactose in milk and serum
J. Dairy Sci. 42, 1390 (1959)

MAYER G., KLEIN M.
Histology and cytology of the mammary gland
In "Milk: mammary gland and its secretion", ed. by Kon S.K. and Cowie A.T., New York, Academic Press (1961)

MUNFORD R.E.
Changes in the mammary glands of rats and mice during pregnancy, lactation and involution
J. Endocrin. 28, 35 (1963)

MUNFORD R.E.
A review of anatomical and biochemical changes in the mammary gland with particular reference to quantitative methods of assessing mammary development
Dairy Sci. Abstr. 26, 293 - 304 (1964)

MOELLERING H., GRUBER W.
Citrat-Lyase und Bestimmung von Citrat
Biochem. Zeitschr. 346, 85 - 88 (1966)

MUNRO H.N., FLECK A.
Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials
Analyst. 91, 78 (1966)

NEUMANN F., von BERSWORDT-WALLRABE, ELGER W., STEINBECK H., HAHN J.D., KRAMER M.
Aspects of androgen-dependent events as studied by anti-androgens
Recent Progr. Hormone Res. 26, Chapt. 9 (1970)

PEARSON D.J.
A source of error in the assay of Acetyl-Coenzym A
Biochem. J. 95, 230 (1965)

ROGNSTAD R., KATZ J.
Gluconeogenesis in the kidney cortex
Biochem. J. 116, 483 (1970)

SCHAMS D., KARG H.
Untersuchungen über Prolaktin im Rinderblut mit einer radioimmunologischen Bestimmungsmethode.
Zentralblatt Vet. Med., Reihe A 17, 193 - 212 (1970)

SIMPSON A.A., SCHMIDT G.H.
Nucleic acid content of rat mammary gland nucleid during pregnancy, lactation and involution.
Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 132, 978 - 983 (1969)

SINHA Y.N., TUCKER H.A.
Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle
J. Dairy Sci. 52, 507 (1969)

SRERE P.A.
The citrate cleavage Enzyme
J. Biol. Chem. 236, 50 (1961)

SRERE P.A.
Citrate-Synthase
In "Methods in Enzymology", Volume XIII P. 3, ed. by Lowenstein J.M., Academic Press, New York and London (1969)

SPENCER A.E., LOWENSTEIN J.M.
Citrate and the conversion of carbohydrate into fat.
Citrate cleavage in obesity and lactation
Biochem. J. 99, 760 (1966)

TAKEDA Y., SUZUKI F., INOUE H.
ATP-Citrate-Lyase
In "Methods in Enzymology", Vol. XIII P. 153, ed. by Lowenstein, Academic Press, New York and London (1969)

TWAROG J.M., LARSON B.L.
Induced enzymatic changes in lactose synthesis and associated pathways of bovine mammary cell cultures
Exptl. Cell Res. 34, 88 (1964)

WALDSCHMIDT M.
Metabolite levels and enzyme activities in the bovine mammary gland in different stages of lactation
I. Metabolite levels related to energy production
J. Dairy Res. im Druck (1973)

WIELAND O.
In "Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse", Zehnte Auflage, sechster Band/Teil B, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1966)

WILLIAMSON J.R., CORKEY B.E.
Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods
In "Methods in Enzymology", Vol. XIII, ed. by Lowenstein, Academic Press, New York and London (1969)

WILLIAMSON J.R. SCHOLZ R., BROWNING E.T.
Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis
J. Biol. Chem. 244, 4617 (1969)

WOLLENBERGER A., RISTAU O., SCHOFFA G.
Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke.
Pflügers Archiv f. ges. Physiol. 270, 399 (1960)

Lebenslauf

Am 7. Mai 1944 wurde ich, Stefan Rilling, als viertes Kind des Arztes Dr. med., Dr. jur. Konrad Rilling und seiner Ehefrau Dr. med. Elisabeth Rilling, geb. Dürr, in Oberkirchberg/ Kreis Ulm, geboren. Mein Vater starb 1945 in russischer Gefangenschaft.

Nach dem Besuch der Grundschule in Oberkirchberg und des Schubardt-Gymnasiums in Ulm bestand ich im Februar 1965 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1965 studierte ich in Erlangen Botanik und Zoologie. Im darauffolgenden Wintersemester begann ich in München mit dem Studium der Tiermedizin, das ich im Oktober 1970 mit dem Staatsexamen abschloß. Meine Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 15. März 1971.

Vom 1. Februar 1971 bis Ende Februar 1972 war ich als Doktorand am Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weihenstephan beschäftigt.

Für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am hiesigen Institut möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. H. Karg meinen besonderen Dank aussprechen.

Fräulein Dr. rer. nat. M. Waldschmidt bin ich für die methodische Einarbeitung und für zahlreiche Ratschläge und kritische Diskussion zu Dank verpflichtet.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. H. Handgrödinger für die Überlassung der Proben am Schlachthof Freising .